

**VALÉRIA DE FREITAS DUTRA**

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA NA  
HETEROGENEIDADE CLÍNICA DE PACIENTES COM DOENÇA  
FALCIFORME.**

Tese apresentada à Escola  
Paulista de Medicina -  
Universidade Federal de São  
Paulo- para obtenção do título  
de Doutor em Ciências.

**SÃO PAULO**

**2019**

**VALÉRIA DE FREITAS DUTRA**

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA NA  
HETEROGENEIDADE CLÍNICA DE PACIENTES COM DOENÇA  
FALCIFORME.**

Tese apresentada à Escola  
Paulista de Medicina -  
Universidade Federal de São  
Paulo - para obtenção do título  
de Doutor em Ciências.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Stella Figueiredo

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alessandra Pontillo

**SÃO PAULO**

**2019**

Dutra, Valéria de Freitas.

**Análise da contribuição do inflamassoma na heterogeneidade clínica de pacientes com doença falciforme.**

**xv,90f**

Valéria de Freitas Dutra, São Paulo, 2019.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação.

**Sickle cell disease: inflammasome contribution to the clinical heterogeneity.** 1.Doença falciforme, 2. Inflamassoma, 3. Monócitos, 4. Polimorfismos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**Escola Paulista de Medicina**  
**Departamento de Oncologia Clínica e Experimental**

**Chefe do Departamento:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Stella Figueiredo

**Coordenador do programa de Pós-Graduação:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisele W. B. Colleoni

**VALÉRIA DE FREITAS DUTRA**

**ANÁLISE DA CONTRIBUIÇÃO DO INFLAMASSOMA NA  
HETEROGENEIDADE CLÍNICA DE PACIENTES COM DOENÇA  
FALCIFORME.**

**Presidente da banca:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Stella Figueiredo

**Banca Examinadora**

**Titulares:**

- 1. Prof. Dr. Rodolfo Delfini Cançado**
- 2. Profa. Dra. Sandra Fátima Menosi Gualandro**
- 3. Profa. Dra. Mariana Lazarini**
- 4. Profa. Dra. Cristiane Damas Gil**

**Suplente:**

- 1. Prof. Dr. Antônio Fabron**
- 2. Prof. Dr. Magnum Nueldo Nunes dos Santos**

## **Dedicatória**

Aos pacientes, que tanto necessitam do desenvolvimento da medicina.

À minha família, da qual tantas vezes estive fisicamente longe.

“Viver e não ter a vergonha de ser feliz. Cantar e cantar e cantar, a beleza de  
ser um eterno aprendiz” (GONZAGUINHA, 1982).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e CNPQ (bolsa de doutorado processo 162577/2015-0).



## **Agradecimentos**

Agradeço à minha orientadora, Dra. Maria Stella Figueiredo, pela contribuição em meu crescimento científico, acadêmico e clínico/ hematológico. Pelo seu exemplo de carinho e preocupação com os pacientes portadores de hemoglobinopatias.

À minha coorientadora, Dra. Alessandra Pontillo, que me recebeu em seu laboratório, acreditou nesse projeto e com quem aprendi sobre o fascinante mundo dos inflamassomas e da imunogenética. Aos seus alunos, que me ajudaram com as técnicas de laboratório e análises: Vinícius, Fernanda, Dhemerson, Iohaña e Edione.

Aos colegas da pós-graduação da Unifesp: Adriano, Thaís, Stella, Cláudia e Jacqueline.

Aos membros da banca de qualificação: Dr. Rodolfo Cançado, Dra. Nicola Conran, Dra. Mariana Lazarini e Dra. Elyse Moritz, que contribuíram com sugestões que enriqueceram esse trabalho.

Aos pacientes e controles que confiaram e concordaram em doar suas amostras para a execução desse estudo.

A todos da minha família- Pais (Oswaldo e Rosângela), a meu noivo Guilherme, à minha irmã Vivian, a meu sobrinho recém chegado (Pedro) e à minha avó Carmélia- que nos deixou em 2016, por terem feito parte desse ciclo da minha vida.

A todos professores que fizeram parte de minha formação.

## SUMÁRIO

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Resumo.....	xv
1. Introdução.....	1
1.1. Desenho do estudo.....	5
1.2. Objetivos.....	6
2.Revisão da literatura.....	7
3.Materiais e métodos.....	25
4.Resultados.....	38
5.Discussão.....	61
6.Conclusão.....	67
Referências.....	69
Anexos.....	79
Abstract.....	90

## Abreviaturas

<b>β-globina</b>	Beta globina
<b>AF</b>	Anemia falciforme
<b>ALT</b>	Alanina amino transferase
<b>AST</b>	Aspartato Amino transferase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>AVC</b>	Acidente Vascular Cerebral
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CKD-EPI</b>	Chronic kidney disease epidemiology colaboration
<b>DAMP</b>	Padrão molecular associado ao dano
<b>DF</b>	Doença falciforme
<b>DHL</b>	Desidrogenase láctica
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>GWAS</b>	Estudos de associação ampla do genoma
<b>HbS</b>	Hemoglobina S
<b>HMGB1</b>	High mobility group box-1
<b>HSP</b>	Heat shock protein
<b>IL</b>	Interleucina
<b>LD</b>	Linkage disequilibrium
<b>NLRP</b>	Nucleotide Binding Domain Leucine-Rich Repeat-Containing Receptor
<b>NFκB</b>	Fator nuclear kappa B
<b>ON</b>	Osteonecrose
<b>OR</b>	Odds Ratio
<b>PAMP</b>	Padrão molecular associado a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico

<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>P2X7</b>	Purinoreceptor 7
<b>RNAm</b>	Mensageiro do ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécie reativa de oxigênio
<b>SNP</b>	Single nucleotide polymorfism
<b>STA</b>	Síndrome toracica aguda
<b>TEP</b>	Tromboembolismo Pulmonar
<b>TGF</b>	Fator de transformação de crescimento
<b>TH1/2</b>	Células T-helper ½
<b>TLR</b>	Receptores do tipo Toll
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TVP</b>	Trombose venosa profunda
<b>TVC</b>	Trombose venosa cerebral

\*Algumas abreviaturas foram mantidas em Inglês para coincidirem com as usadas nas publicações.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Anotações históricas do Dr. Ernest Iron.....	8
Figura 2-	Localização do gene da $\beta$ -globina.....	10
Figura 3-	Mecanismos envolvidos na Doença Falciforme.....	12
Figura 4-	Formação do complexo do inflamassoma.....	20
Figura 5-	Polimorfismos do genes relacionados ao complexo inflamassoma.....	33
Figura 6-	Exemplo de discriminação alélica por um polimorfismo de base unica.....	34
Figura 7-	Exemplo de avaliação da ativação da caspase-1, através da sonda fluorescente FLICA.....	37
Figura 8-	Resultado do desequilíbrio de ligação (LD) para os SNPs analisados.....	40
Figura 9-	Associação entre os SNPs do inflamassoma e os valores de <i>p-value</i> ajustados, para o critério gravidade.....	41
Figura 10-	Associação entre os SNPs do inflamassoma e os valores de <i>OR</i> e a gravidade da apresentação clínica.....	41
Figura 11-	Interação entre SNPs no modelo dominante quando considerada a variável hepatopatia.....	44
Figura 12-	Interação entre SNPs no modelo recessivo quando considerado a variável nefropatia.....	45
Figura 13-	Interação entre o rs16944 e o rs10754558, na manifestação clínica AVC.....	45
Figura 14-	Interação entre o rs16944 e o rs111651270, na manifestação clínica dor.....	46
Figura 15-	Associação de valores absolutos de leucócitos e monócitos com o rs1834451 (IL-18).....	48
Figura 16-	Associação entre valores de creatinina e o rs10754558 (NLRP3).....	49
Figura 17-	Interação entre os SNPs rs16944 e rs10754558, quando avaliada a variável creatinina.....	50
Figura 18-	Associação entre ferritina e polimorfismos do gene do inflamassoma.....	51
Figura 19-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis.....	52
Figura 20-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis, inibidos com a molécula MCC-950.....	53
Figura 21-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis estimulados com flagelina.....	54
Figura 22-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis estimulados com valbopro.....	54
Figura 23-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis inibidos com partenolideo.....	55
Figura 24-	Produção de IL-1 $\beta$ em PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com AF.....	56
Figura 25-	Produção de IL-1 $\beta$ em PBMC de pacientes com AF e indivíduos saudáveis inibidos com CGI-1746 e MCC-950.....	57
Figura 26-	Produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF, comparando indivíduos tratados e não tratados.....	58
Figura 27-	Produção de IL-1 $\beta$ em PBMC de pacientes com AF, comparando indivíduos tratados e não tratados.....	58
Figura 28-	Ativação de caspase-1 em linfócitos (CD19+) de PBMC de indivíduo controle e paciente AF.....	59
Figura 29-	Ativação de caspase-1 em monócitos (CD14+) de indivíduo controle e paciente AF (n=1) .....	59

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Comparação entre a hemoglobina S e hemoglobina A.....	9
Tabela 2-	Patógenos mais comuns associados à infecção na DF com os possíveis mecanismos envolvidos.....	13
Tabela 3-	Manifestações clínicas da doença falciforme, acometimento sistêmico e mecanismos envolvidos.....	13
Tabela 4-	Principais DAMPs envolvidos na inflamação na DF e sua função celular.....	17
Tabela 5-	Manifestações clínicas em doenças gerais que, por outros mecanismos, também podem ocorrer em DF e estudos de associação de polimorfismos do inflamassoma.....	24
Tabela 6-	Dados demográficos dos pacientes com doença falciforme.....	27
Tabela 7-	Distribuição das manifestações clínicas de pacientes com anemia falciforme SS/S $\beta$ .....	28
Tabela 8-	Características laboratoriais de pacientes com anemia falciforme SS/S $\beta$ .....	29
Tabela 9-	Dados demográficos e clínicos de pacientes com AF, incluídos no teste celular.....	30
Tabela 10-	Seleção de SNPs. Apresenta-se a lista de SNPs selecionados com informações como identificação, localização, frequência alélica e efeito funcional, com a respectiva citação da literatura.....	31
Tabela 11-	Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequência do maior alelo.....	39
Tabela 12-	Resultados da análise de desequilíbrio de ligação (LD) dos SNPs nos genes do inflamassoma.....	40
Tabela 13-	Resultado detalhado da análise de distribuição da variante significativamente associada com a gravidade da DF.....	42
Tabela 14-	Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma com as manifestações clínicas da DF.....	43
Tabela 15-	Associação entre dados do leucograma e os SNPs de polimorfismo do inflamassoma.....	47
Tabela 16-	Associação entre os SNPs de polimorfismo do inflamassoma, dados laboratoriais relacionados à hemólise e ferritina.....	49
Tabela 17-	Resultados de associação com o clearance da creatinina.....	50
Tabela 18-	Resultado detalhado da análise de distribuição de variantes e gravidade da DF.....	83
Tabela 19-	Resultado detalhado da análise do rs16944 (IL-1 $\beta$ ) associado com a manifestação clínica osteonecrose.....	84
Tabela 20-	Resultado detalhado da análise de manifestações clínicas trombóticas e os 10 SNPs escolhidos no modelo codominante.....	84
Tabela 21-	Resultado detalhado da análise de aumento de ácido úrico e os 10 SNPs escolhidos no modelo codominante.....	85

## RESUMO

**Introdução:** A doença falciforme (DF) é causada por uma simples mudança de base (adenina por timina, c.20A>T) no gene da cadeia da  $\beta$ -globina, com produção de hemoglobina S. Os principais mecanismos fisiopatológicos da DF envolvem anemia hemolítica e eventos vaso-oclusivos. Apesar da patogênese comum, os pacientes com DF apresentam quadros clínicos variados e diferentes graus de gravidade. A inflamação é uma característica frequente e vários padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como a própria hemoglobina falciforme, podem ativar o complexo inflamassoma com consequente produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18. Variantes genéticas nos componentes do inflamassoma foram previamente associadas a manifestações clínicas que também ocorrem nos pacientes com DF. Portanto, levantamos a hipótese de que o inflamassoma possa contribuir na patogênese da DF e explicar, pelo menos em parte, a heterogeneidade clínica da doença. **Objetivos:** Avaliar a distribuição de polimorfismos nos principais genes do inflamassoma de acordo com a gravidade da DF e analisar a ativação do complexo em monócitos e PBMC dos pacientes. **Material e métodos:** Foram analisadas 10 variantes gênicas funcionais nos principais componentes do inflamassoma em uma coorte de 161 pacientes com DF (SS/S $\beta$ ) através de ensaios alelo-específicos e qPCR. A distribuição dos polimorfismos foi avaliada através de análise multivariada, de acordo com a gravidade da DF e de dados clínicos e laboratoriais. A ativação do inflamassoma em monócitos e PBMC isolados de sangue periférico foi comparada entre pacientes (n=10) e controles (n=9), através de dosagem de IL1- $\beta$  pelo método de ELISA. **Resultados:** O polimorfismo ganho-de função rs16944 no gene *IL1 $\beta$*  resultou em um fator protetor para gravidade da DF. A variante perda-de-função no gene *IL18* (rs1834481) associou-se com valores mais altos de monócitos e leucócitos. No teste funcional, pacientes com AF tendem a ativar menos o inflamassoma quando comparados aos controles. **Conclusão:** O polimorfismo da *IL1 $\beta$*  (-511C>T) pode contribuir na heterogeneidade clínica da DF, além de que, quando comparados a controles normais, os monócitos e PBMC desses pacientes tendem a produzir menos IL1 $\beta$ .

**Palavras-chave:** Doença falciforme, Inflamassoma, Monócitos, Polimorfismos.





A doença falciforme (DF) é uma doença mendeliana, monogênica, recessiva causada pela mutação do gene da  $\beta$ -globina (HbS; glu7val), que do ponto de vista clínico apresenta uma enorme variabilidade fenotípica (STEINBERG, 2005).

Ocorre uma lesão orgânica crônica, causada pela hemólise, vaso-oclusão, infecções e inflamação, gerando uma menor expectativa de vida e morbidade, com episódios de dor, idas ao pronto socorro, uso crônico de analgésicos (PLATT, 1994) ou dependência funcional por restrições como AVC ou osteonecrose. Ainda não se sabe quais os fatores contribuintes na variabilidade interindividual observada nestes pacientes.

A polimerização da hemoglobina, com oclusão da microcirculação, não justifica todos os fenômenos que ocorrem na doença. A lesão endotelial gera migração e adesão leucocitária e eritrocitária, tendo sido relatada a elevação do nível de citocinas plasmáticas, como fator de necrose tumoral - alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8), sendo que essas citocinas podem estar aumentadas mesmo em períodos fora de crise (PATHARE *et al.*, 2004; QUARI, DIER e MUSA, 2012). Ainda é difícil identificar os eventos exatos que desencadeiam o estado inflamatório crônico da DF. As respostas inflamatórias são importantes complicações da doença, incluindo auto-esplenectomia, síndrome torácica aguda, hipertensão pulmonar, úlceras de perna, nefropatia e acidente vascular cerebral (CONRAN e BELCHER, 2018).

Apesar da vacinação e da profilaxia com penicilina desde a infância, com a redução da incidência de eventos infecciosos, não é possível afastar que as infecções bacterianas também sejam desencadeadoras de respostas inflamatórias na DF, devido à maior ativação de neutrófilos e liberação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que podem estimular células inflamatórias, agravando esses processos e desencadeando vias de imunidade inata (CONRAN e BELCHER, 2018).

Desde 2002 existe o conceito do complexo do inflamassoma, que está associado à resposta imune inata e à manutenção da homeostase. A principal ação desencadeada pela ativação desse complexo é a liberação de citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18

(MARTINON *et al.*, 2002) e a indução da morte celular por piroptose, gerando um ambiente pró-inflamatório (LIU *et al.*, 2016).

Ou seja, em resumo, inflamassomas são moléculas sinalizadoras ativadas por microorganismos ou estresse estéril. Trata-se de um complexo multimérico de proteínas citoplasmáticas, que uma vez ativado, resulta em uma via final em que a pró-IL-1 $\beta$  e a pró IL-18 são clivadas e transformadas em suas formas ativas. (SAAVEDRA *et al.*,2015).

A IL-1 $\beta$  atua na defesa do hospedeiro e na resposta inflamatória aguda local e sistêmica, ativando uma resposta adaptativa de tipo Th17. Já a IL-18 é importante na manutenção da homeostase e na defesa, contribuindo para ativação de uma resposta Th1 e citotóxica de células NK e linfócitos T CD8+ (MANTOVANI *et al.*, 2019). Assim, através do inflamassoma há ativação de outras vias inflamatórias intracelulares, com recrutamento leucocitário e estresse oxidativo. Esse mecanismo já foi relacionado a uma variedade de doenças, incluindo as neurodegenerativas, metabólicas e imunes (SAAVEDRA *et al.*,2015; OWUSU-ANSAH *et al.*,2015).

Como a IL-1 $\beta$  e IL-18 têm mostrado participação no contexto inflamatório da DF e o complexo inflamassoma já foi associado a outras doenças (Zhu *et al.*,2018; Soares *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019) , é plausível a idéia de que esse complexo tenha contribuição nas manifestações clínicas desses pacientes.

Estudo em animais demonstrou que a hemólise (comum nesses pacientes) causaria a ativação do inflamassoma aumentando a letalidade (DUTRA *et al.*, 2014). Ou seja, não apenas a infecção (PAMPs), mas o heme e outros fenômenos que ocorrem na DF também poderiam agir como moléculas associadas ao dano (DAMPs) (OWUSU-ANSAH *et al.*,2015), como o ácido úrico (CERQUEIRA *et al.*, 2011), ATP e DNA livre (CONRAN e BELCHER, 2018).

Estudo de 2016 sugeriu a participação do inflamassoma na DF ao encontrar em cultura de monócitos de sangue periférico desses pacientes maior expressão de TLR-2, TLR-4, TLR-5, NLRP3 e IL-1 $\beta$  quando comparados ao controle saudável (PITANGA *et al.*, 2016). Algumas revisões (CONRAN e BELCHER, 2018; SUNDD,2019) em DF citam a possibilidade desse mecanismo, porém nenhum

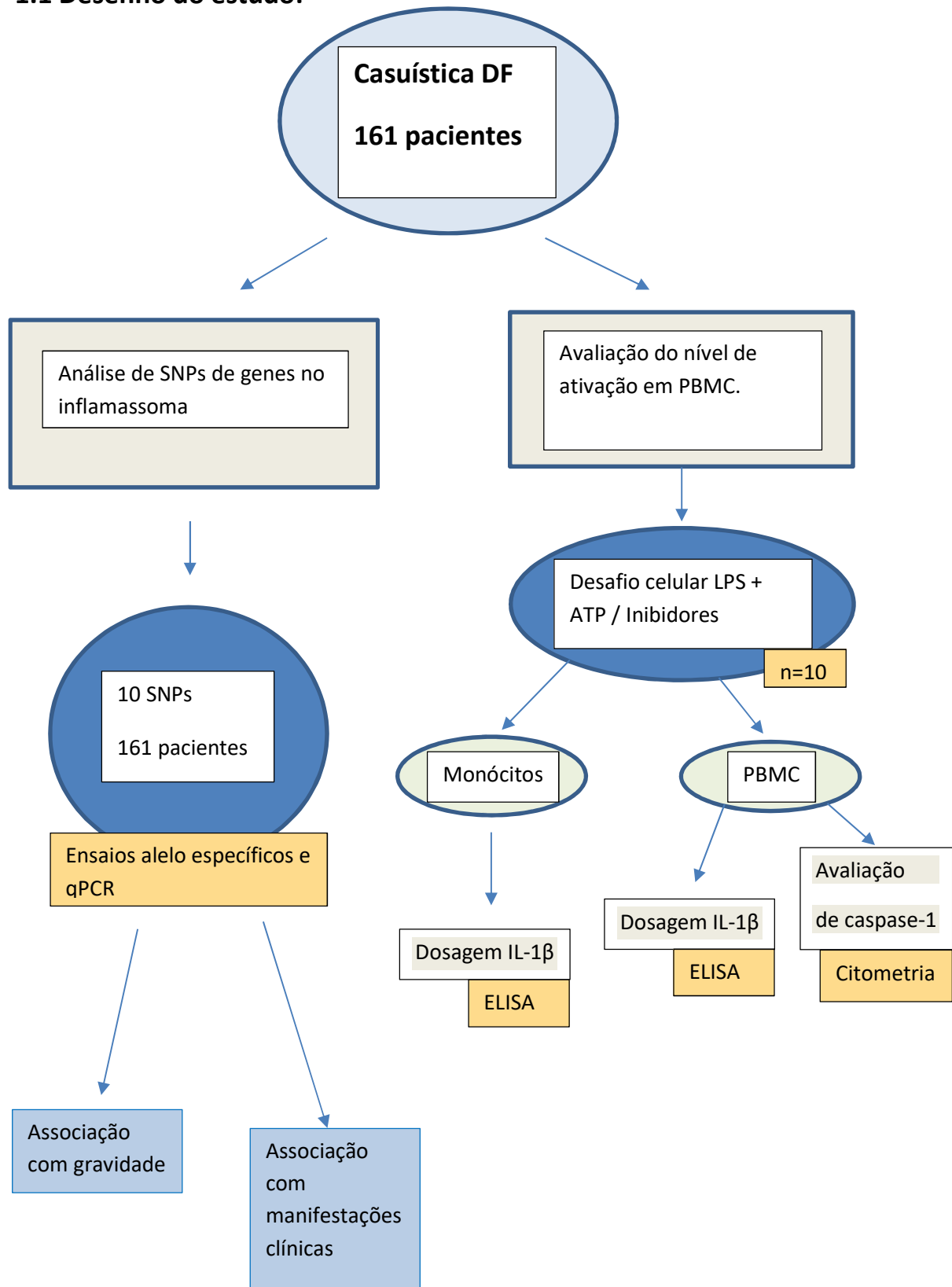
estudo até o momento descreveu funcionalmente a ativação do inflamassoma nos monócitos desses pacientes.

Além da atuação funcional, a genética do inflamassoma tem sido muito investigada em relação à autoinflamação, com pesquisas mais recentes com câncer e outras doenças neurodegenerativas (CONFORTI-ANDREONI *et al.*, 2011).

Na DF alguns polimorfismos tiveram associação com manifestações clínicas, como nos genes que codificam IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , com associações com complicações infecciosas e acidente vascular cerebral. Genes na via de sinalização *TGF $\beta$  / BMP* foram associados à incidência de úlcera de perna e o SNP *IL1 $\alpha$*  (rs1800587) associado à dor crônica na DF (CONRAN e BELCHER, 2018). Até o presente momento, também não há nenhum trabalho que associe a genética do inflamassoma a manifestações clínicas da DF.

Portanto, levantamos a hipótese de que existe participação do inflamassoma na inflamação crônica da DF, considerando que polimorfismos genéticos nos principais componentes do inflamassoma foram associados à inflamação crônica e que vários genes fora da cadeia da  $\beta$ -globina já foram demonstrados como genes modificadores da doença (STEINBERG e SEBASTIANI, 2012), ou seja, a genética do inflamassoma, afetando a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 e, consequentemente modulando a resposta inflamatória do indivíduo, também pode contribuir para a heterogeneidade clínica observada nesses pacientes.

### 1.1 Desenho do estudo:



## 1.2 Objetivos

### Principal:

- Avaliar a contribuição do inflamassoma na heterogeneidade clínica observada em pacientes com Doença Falciforme SS e S $\beta$ , colaborando para a identificação de novos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na doença e de possíveis marcadores prognósticos.

### Específicos:

- Avaliar a distribuição de polimorfismos que afetam a ativação do inflamassoma em paciente com DF associando-os com a gravidade da doença e manifestações clínicas.
- Avaliar a capacidade de resposta a PAMPs (LPS) e DAMPs (ATP) nos pacientes com DF/SS (AF).



## 2.1. Doença falciforme

Era 1904 quando Walter Clement Noel, um estudante de 20 anos, do primeiro ano do curso de odontologia (Chicago College of Dental Surgery), proveniente de Granada, deu entrada no hospital Presbiteriano de Chicago com queixa de insuficiência respiratória. Foi atendido pelo então internista Dr. Ernest E. Irons que fez um esfregaço de sangue periférico e observou hemácias de formato diferente (Figura 1), fato nunca descrito até então. O achado foi reportado ao clínico assistente, Dr. James B. Herrick, que o publicou em 1910, no *Archives of Internal Medicine*, sem ter, contudo, um diagnóstico, apesar de dois anos e meio de intenso seguimento clínico, em que foram presenciadas crises dolorosas de repetição (SAVITT e GOLDBERG, 1989).

**Figura 1- Anotações históricas do Dr. Ernest Iron.** Nota-se a descrição de células irregulares, alongadas, além da leucocitose. Fonte: SAVITT e GOLDBERG, 1989.

<b>The Presbyterian Hospital, Chicago, Ill.</b>			
<b>EXAMINATION OF BLOOD.</b>			
Case Number		Date	12/31
Name of Patient	Noel	Room or Ward	7
<b>MACROSCOPICAL AND QUANTITATIVE.</b>			
Appearance	pale	Coagulability	
Erythrocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss)	2,880,000		
Leucocytes per cu. mm. (Thoma Zeiss)	15,250		
Hemoglobin (Von Fleischl)	50%	Corrected	
Specific gravity		Volume index	
Color index			
<b>MICROSCOPICAL.</b>			
<b>Fresh Specimen.</b>			
Erythrocytes—Color		Shape	very irregular many elongated
Size	irregular - many large	Rouleaux formation	none
Leucocytes—Apparent increase in number	average size about normal		
Ratio of granular to non-granular			
Fibrin	Blood-platelets	Pigment	
Plasmodium malariae			
Miscellaneous			

*per cu. mm. 3700 cells & very small refractile nuclei (unclear reds?) (red count preparation)*

Fonte: SAVITT e GOLDBERG, 1989.

Após a publicação, novos casos foram descritos e houve o desenvolvimento de hipóteses relacionadas aos possíveis mecanismos da doença, como a questão da desoxigenação e da deformação da membrana do eritrócito. Em 1930 foi relatado um caso de doença falciforme (DF) em que o experimento *in vivo* (estase no dedo de uma menina de 7 anos com sintomas da doença) demonstrou que a falcização dependia da pressão parcial de O<sub>2</sub>, ocorrendo em pressões abaixo de 45 mmHg (SCRIVER E WAUGH, 1930). Ao longo da história, a DF teve destaque por ter sido a primeira doença de mecanismo molecular descrito. Em 1949, um trabalho realizou eletroforese de hemoglobinas e identificou que os eritrócitos do grupo controle possuíam 100% de migração normal, enquanto o grupo anemia falciforme tinha 100% de hemoglobina S. O terceiro grupo, já denominado traço falciforme na época, apresentou 40% de hemoglobina S e 60% de hemoglobina normal, o que fez com que os pesquisadores acreditassem que havia uma participação genética no mecanismo da doença e concluíssem que havia uma alteração alélica em um único gene envolvido na síntese de hemoglobina (PAULING *et al.*, 1949). Em 1977, um estudo com o RNA mensageiro da  $\beta$ -globina humana mostrou que uma simples mudança de base (adenina por timina, ou seja, alteração de nucleotídeo c.20A>T), causaria uma troca de aminoácidos, formando um códon GTG que codifica valina (Tabela 1), resultando no que conhecemos hoje como hemoglobina S ( $\alpha_2\beta_2$  <sup>7</sup>Glu-Val), que assim como a hemoglobina A contém duas cadeias  $\alpha$  e duas cadeias  $\beta$  (INGRAM, 195; MAROTTA *et al.*, 1977).

**Tabela 1- Comparação entre a hemoglobina S e hemoglobina A.** São mostradas as sequências de aminoácidos para cada tipo de hemoglobina (A- normal e S – falciforme)

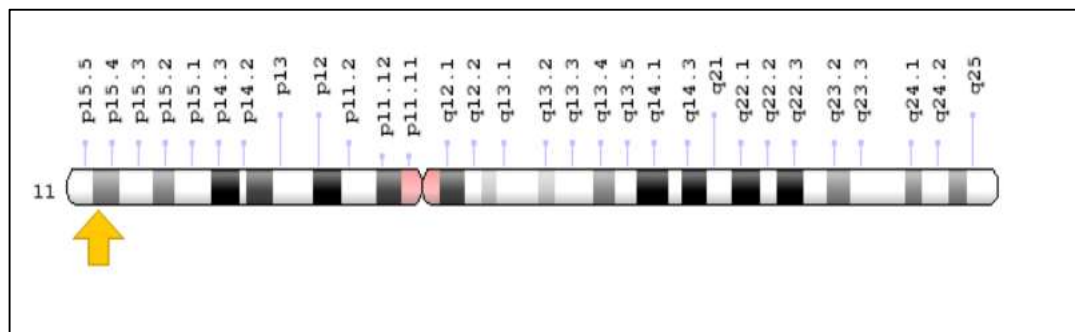
Tipo de Hemoglobina	Sequência de aminoácidos (códon 6,7 e 8).
A	Pro- Glu - Glu CCT GAG GAG
S	Pro - Val - Glu CCT GTG GAG

Fonte: Autor.



De acordo com a última atualização do *Genome Conference Consortium* (*Homo sapiens Updated Annotation Release 109.20190607*, GRCh38.p13), em março de 2019, a localização citogenética do gene da  $\beta$ -globina está no braço curto do cromossomo 11, na posição 15.4 (11p15.4) (Figura 2) e a localização molecular da troca de bases encontra-se entre as bases de pares 5.225.464 a 5.227.071, sendo conhecida como rs334 (CLINVAR, 2019). Além disso, pela nomenclatura padrão da alteração de proteína deveria-se usar “p.Glu7Val”, pois a nomenclatura anterior, “p.Glu6Val”, muito comum na literatura, considera a numeração sem a primeira metionina, que na cadeia madura da  $\beta$ -globina encontra-se clivada (LEONARD, p.230, 2016).

**Figura 2- Localização do gene da  $\beta$ -globina:** braço curto do cromossomo 11, na posição 15.4.



Fonte: NIH/ Genetics Home Reference, 2019.

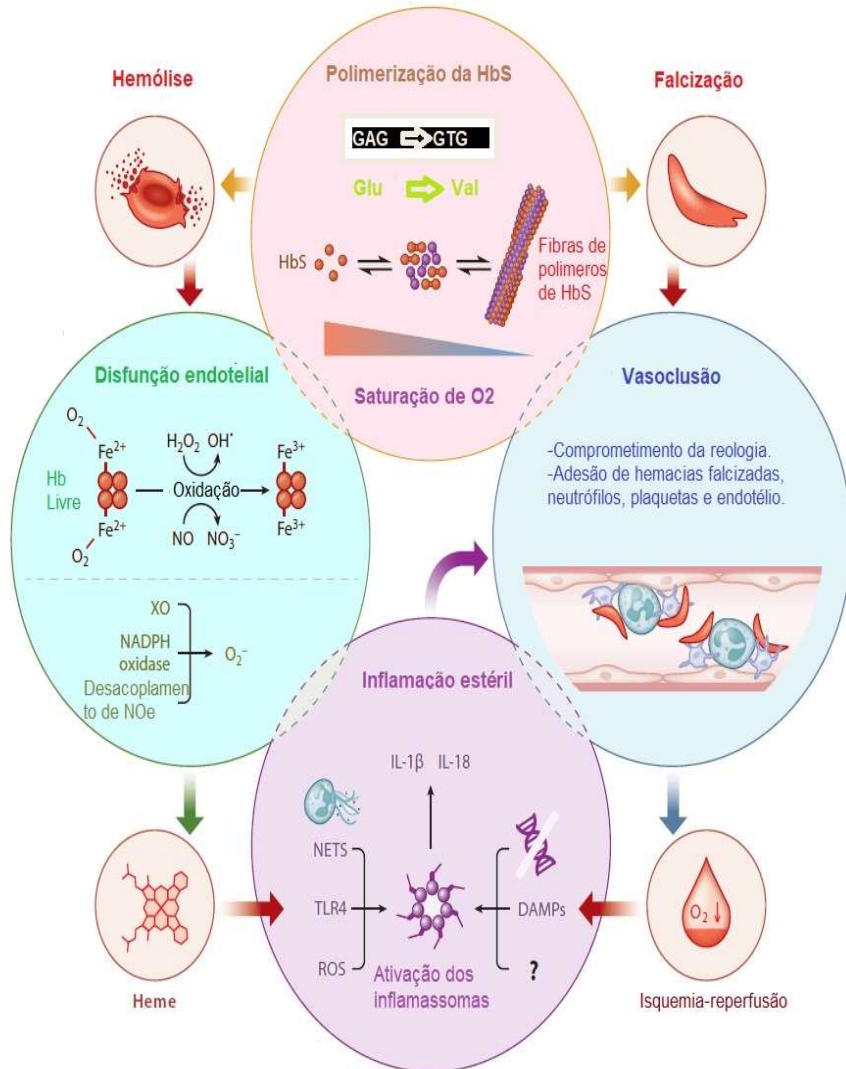
Cerca de 3,2 milhões de pessoas têm doença falciforme no mundo e aproximadamente 176000 morrem ao ano por complicações da doença (SUNDD *et al.*, 2019). Na década de 90, a média de idade de óbito nos indivíduos SS era de apenas 42 anos para homens e 48 anos para mulheres (PLATT *et al.*, 1994) e, na maioria das vezes, a doença é negligenciada, incapacitante e mais frequente em populações menos favorecidas.

No Brasil, estima-se que 25000 a 30000 pessoas tenham a doença em estado homozigótico (SS – anemia falciforme) ou na condição de heterozigotos compostos ou duplos (SC, SE, SD, S $\beta$ ), com nascimento de 3500 casos novos/ ano, sendo que esses pacientes necessitam de medidas preventivas e tratamento das complicações agudas e crônicas (CANÇADO E JESUS, 2007).

### **2.1.1 Manifestações clínicas e mecanismos fisiopatológicos**

Na prática clínica, existe grande variabilidade interindividual quanto à forma de apresentação. Os princípios gerais de genética molecular, biologia celular e mecanismos fisiopatológicos conhecidos, ainda são insuficientes para explicar essas diferenças. A doença é multissistêmica, associada a episódios agudos e a um quadro crônico, com lesão progressiva dos órgãos (ATAGA e STOCKER, 2015), existindo, basicamente, dois processos fisiopatológicos: a hemólise e a vasocclusão com o processo de isquemia-reperfusão, que pode ser acompanhado de injúria tecidual e inflamação, com aumento de expressão de moléculas de adesão, aumento de citocinas inflamatórias e leucocitose, além de aumento da produção de ROS e consumo de óxido nítrico (ATAGA e STOCKER, 2015; BELCHER *et al.*, 2000; HEBBEL *et al.*, 2014). Em um conceito mais atual, a Figura 3 ilustra os mecanismos envolvidos na doença, havendo destaque para a participação da inflamação estéril, dos receptores do tipo Toll-like e da ativação do complexo do inflamassoma.

**Figura 3- Mecanismos envolvidos na Doença Falciforme.** Os mecanismos envolvidos na doença incluem vasocclusão, polimerização, disfunção endotelial e a inflamação estéril, com participação dos inflamassomas.



Fonte: Traduzido e adaptado de SUNDD, 2019.

Além disso, pacientes com DF têm maior predisposição a infecções, como mostra a Tabela 2, sendo os possíveis mecanismos envolvidos fatores como a asplenia funcional, defeitos na ativação do complemento e características genéticas, como polimorfismos nos genes do TGF- $\beta$  (envolvidos no crescimento, diferenciação e desenvolvimento celular) (BOOTH, INUSA e OBARO, 2010). Desde o início da década de 80, o uso da penicilina profilática diminuiu a mortalidade por infecções, principalmente no grupo pediátrico (COBER e PHELPS, 2010), aumentando a sobrevivência desses pacientes.

**Tabela 2- Patógenos mais comuns associados à infecção na DF com os possíveis mecanismos envolvidos.**

<b>Patógenos</b>	<b>Mecanismos envolvidos</b>
Bactérias encapsuladas ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> ) <i>Salmonellae</i>	Asplenia funcional  Comprometimento da opsonização Infarto e permeabilidade intestinal Disfunção leucocitária
Malária	Diminuição da solubilidade da deoxihemoglobina S
Parvovírus	Aumento do <i>turn over</i> de eritrócitos
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Sobrecarga de ferro
<i>Mycoplasma</i>	Desconhecido

Traduzido e adaptado de: BOOTH, INUSA e OBARO, 2010

Com a sobreposição de diversos fatores na doença, na prática clínica há um amplo espectro de manifestações, com a maioria dos pacientes tendo acometimento de mais de um sistema.

A Tabela 3 faz um resumo das manifestações clínicas mais comuns, bem como o acometimento de sistemas e órgãos.

**Tabela 3- Manifestações clínicas da doença falciforme, acometimento sistêmico e mecanismos envolvidos.**

<b>Sistema</b>	<b>Complicação</b>	<b>Patologia/ Imagem</b>	<b>Mecanismos propostos</b>
<b>SNC</b>	<b>AVC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperplasia de artéria intimal média e grande</li> <li>• Trombose de grandes vasos</li> <li>• Aneurismas saculares</li> <li>• Síndrome de Moya-Moya</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Queda da reserva funcional, com aumento do fluxo sanguíneo cerebral</li> <li>• Diminuição da autorregulação vascular</li> <li>• Ativação hemostática</li> </ul>

continua

continuação			
<b>Sistema</b>	<b>Complicação</b>	<b>Patologia/ Imagem</b>	<b>Mecanismos propostos</b>
<b>Sistema Cardiopulmonar</b>	Comprometimento cognitivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AVC silencioso</li> <li>• Rarefação de pequenos vasos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disfunção de pequenos vasos?</li> </ul>
	Hipertensão pulmonar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lesões plexiformes</li> <li>• Hiperplasia intimal</li> <li>• Trombose intraluminal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ativação hemostática</li> <li>• Consumo de NO pela hemoglobina livre</li> </ul>
	STA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infarto pulmonar em cunha</li> <li>• Trombose pulmonar in situ</li> <li>• Infarto costal</li> <li>• Derrame pleural</li> <li>• Consolidações multilobulares</li> <li>• Trombose arteriolar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atelectasia e hipoventilação central</li> <li>• Estimulação de TLR4 e inflamassomas</li> <li>• Hiperadesão de plaquetas e neutrófilos</li> <li>• Infecção</li> </ul>
	Doença pulmonar restritiva	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição da capacidade de difusão pulmonar</li> <li>• Fibrose pulmonar nas bases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de fibrócitos em número e mais ativados</li> </ul>
<b>Sistema Genito-urinário</b>	Priapismo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comprometimento do fluxo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depleção de NO</li> <li>• Aumento de adenosina</li> <li>• Precipitação de hemácias</li> </ul>
	DRC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GESF</li> <li>• Anormalidades mesangiais</li> <li>• hiperfiltração</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Injúria glomerular</li> <li>• Tráfico de macromoléculas no espaço mesangial</li> </ul>

continua

continuação

Sistema	Complicação	Patologia/ Imagem	Mecanismos propostos
<b>Hepático</b>	Necrose papilar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Áreas hipoatenuantes triangulares</li> <li>• Aumento de parênquima renal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isquemia medular</li> <li>• Aumento de viscosidade</li> </ul>
	Sequestro hepático	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hepatomegalia aguda</li> <li>• Sinusoides dilatados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sequestro massivo de hemácias</li> <li>• Compressão de ductos biliares por sinusóides alargados</li> </ul>
	Crise hepática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obstrução sinusoidal</li> <li>• Dilatação de canalículos biliares</li> <li>• Hiperplasia de células de Kupfer</li> <li>• Necrose centro lobular</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Isquemia e infarto causados por vasoclusão</li> <li>• Colestase, necrose intra hepática</li> </ul>

Fonte: traduzido e adaptado de SUNDD, 2019.

Diante de tal heterogeneidade, também é importante destacar que a literatura atual carece de dados para uma estratificação por gravidade, o que certamente prejudica a reprodutibilidade de estudos básicos ou mesmo a equiparação em *trials* clínicos. Abaixo estão relacionados alguns critérios encontrados:

- SCDSM-10 (Sickle cell disease severity measure): criado para um estudo clínico, avalia sintomas diários (BURKE et al, 2016);
- Mikobi et al. 2016, usou um score que considera dia de hospitalização, crise vasoclusiva e transfusão/ano, úlcera de perna, osteonecrose de quadril, complicações hepatobiliares, eventos neurológicos, acometimento renal e índice de massa corpórea;

- Afenyi-Anan et al, 2008, utilizou um score calculado na presença ou ausência de: disfunção pulmonar, renal, anormalidade de sistema nervoso central, osteonecrose e úlceras de perna;
- Sickle Cell Disease Severity Calculator, um score criado para avaliar risco de morte (SEBASTIANI et al., 2007). Coelho et al 2012, comparando esse score não encontrou os resultados esperados. Considerou como possível viés a inclusão do fator sepse, pouco visto hoje em dia, e o fato do score não considerar a recorrência de sintomas;
- Em 2007, foi proposto um modelo de subfenótipos, em que pacientes com níveis de hemoglobina mais altos tinham uma frequência maior de complicações de viscosidade e vasoclusão e isso incluía manifestações como crises dolorosas, STA e osteonecrose. Por outro lado, um quadro de hemólise/disfunção endotelial, envolvendo vasculopatia proliferativa e disfunções vasomotoras, incluía as manifestações como úlcera de pernas, priapismo, hipertensão pulmonar e AVC (KATO et al., 2007);
- Outra possibilidade seria a classificação desses pacientes por indicação de transplante de medula óssea, porém levantamento de dados anterior de nosso grupo mostrou que, em adultos, cerca de 75% de pacientes teriam critérios clínicos para indicação.

### **2.1.2 Inflamação na DF**

Com o aumento da sobrevida desses pacientes, a inflamação começou a ter maior destaque na fisiopatologia da doença.

Hoje se sabe que a alteração no gene da  $\beta$ -globina gera disfunção da hemoglobina, que se torna capaz de polimerizar perante desoxigenação, causando uma obstrução tecidual aguda e crônica, com estímulo ao endotélio vascular e liberação de citocinas, fatores de crescimento, ativação celular e diminuição de NO biodisponível (PLATT, 2000; HEBBEL, OSAROGIAGBON e KAUL, 2004). Alguns estudos in vitro, do início do século XXI, mostraram a participação do aumento de IL1- $\beta$  relacionado à inflamação crônica e à ativação celular, com maior produção de citocinas (PERELMAN *et al.*, 2003; BELCHER *et al.*, 2000; CONRAN *et al.*, 2007).

A hemólise é um dos mecanismos inflamatórios principais, com geração de DAMPS (moléculas associadas ao dano). A Tabela 4 mostra os principais DAMPS envolvidos na DF.

**Tabela 4- Principais DAMPs envolvidos na inflamação na DF e sua função celular.** A tabela mostra o DAMP, sua provável origem e a função celular.

DAMP	Origem	Função celular
Heme	Hemólise	Liberado pela hemoglobina livre
ATP	Hemólise e células necróticas	Fonte de energia, liberado mediante stress e dano tecidual
HMGB1	Células necróticas	Proteína nuclear
DNA extracelular	Células necróticas	Morte celular e NETose

Adaptado e traduzido de: CONRAN e BELCHER,2018.

Outro fator importante na inflamação é o tipo de célula envolvida e sua capacidade de ativação. As hemácias falcizadas são capazes de gerar agregados celulares com neutrófilos e plaquetas, capazes de se aderirem ao endotélio. Somado a isso, as plaquetas mostram um perfil mais ativado, com mais expressão de p-selectina (ZHANG *et al.*, 2016). A interação plaqueta-monócitos está relacionada a mecanismos de trombose e inflamação e, estudos *in vitro*, têm demonstrado que o contato com plaquetas induz o monócito a aumentar a secreção de citocinas, além de haver uma diferenciação e aumento de expressão de CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, considerados monócitos de perfil mais inflamatório (ORSINI *et al.*, 2011).

Belcher *et al.*, 2002, fez um experimento em que células endoteliais incubadas com mononucleares de pacientes AF apresentavam mais expressão de moléculas de adesão e fator tissular do que o controle normal, concluindo que seriam os monócitos as células capazes de ativar o endotélio.

Adicionalmente, os neutrófilos também têm participação na inflamação, pois expressam moléculas que os tornam mais sensíveis à adesão endotelial e à ativação por citocinas (LUM *et al.*, 2004), como IL-1 $\beta$ (PERELMAN *et al.*, 2003). Mesmo fora de crise, em culturas *in vitro*, os neutrófilos AF demonstraram ter uma maior



sobrevida quando comparados ao controle normal, o que sugere uma inibição da apoptose. Também há aumento de níveis circulantes de IL-8, fator estimulador de granulócitos, TNF- $\alpha$ , IL-6 e 3 e prostaglandina E2 (PGE2) (CONRAN *et al.*, 2007). Sendo assim, há um ambiente de inflamação crônica, em que as lesões de isquemia-reperfusão se perpetuam (WANDERER, 2009).

Estudo com proteína C reativa (PCR) mostrou um aumento da mortalidade de acordo com níveis mais elevados de PCR, sendo esse efeito mais importante na coorte de pacientes AF (HbSS; OR= 3,4; IC95%:1.9–6.3;  $P<0.0001$ ) em relação ao controle. Esses dados sugeriram uma interligação entre inflamação e morte (VAN BEERS, 2014).

## 2.2 O complexo do inflamassoma

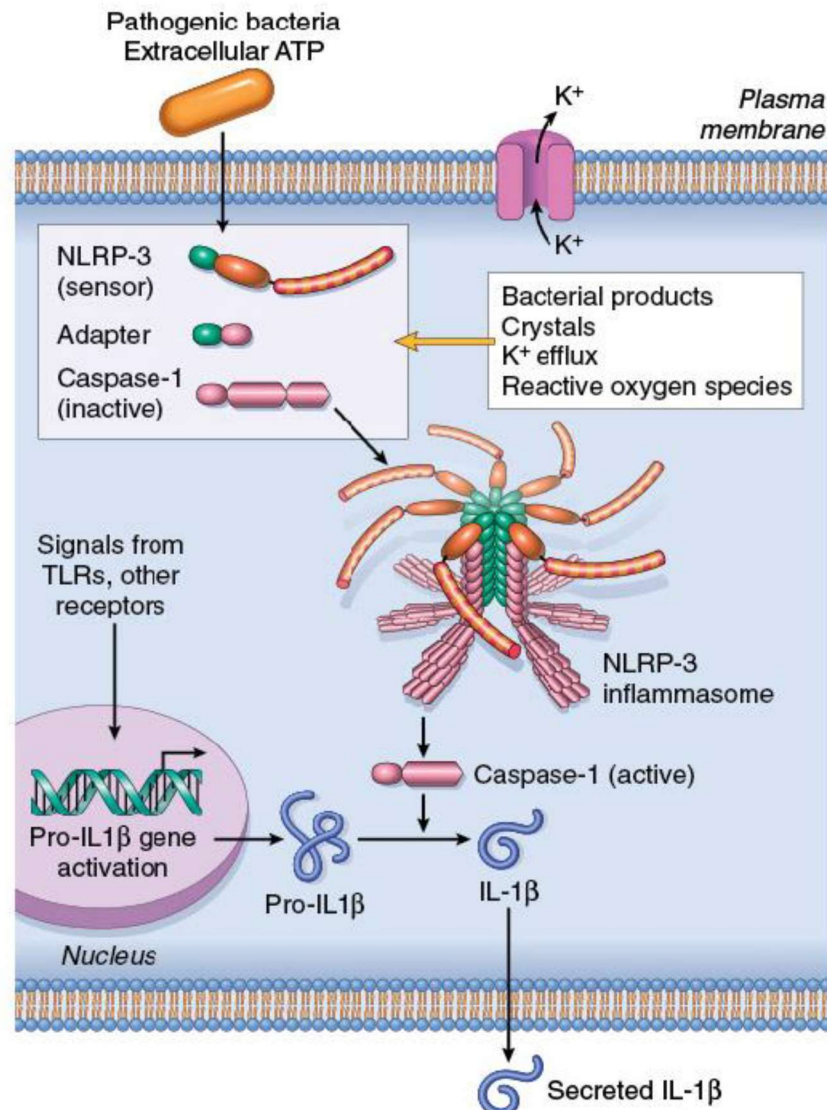
O inflamassoma é um complexo citosólico que se forma em resposta a padrões moleculares associados a patógeno (PAMPs) e/ou dano (DAMPs), pela interação entre receptores citoplasmáticos da imunidade inata, tais como as proteínas que contêm os domínios NACHT, LRR e PYD (do inglês “NACHT and LRR receptor containing a PYD domain”/NLRP) (ex: NLRP1, NLRP3, NLRC4), ou receptores de DNA, tais como a proteína ausente no melanoma 2 (AIM-2, do inglês “Absent in Melanoma-2”); a proteína adaptadora ASC, e a caspase inflamatória, caspase-1. O receptor, quando estimulado, recruta ASC e a caspase-1, e ativa o processamento e a liberação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$  e IL-18 (MARTINON, 2002). Mais recentemente, também foi atribuído a ele um mecanismo de morte celular inflamatória, denominado piroptose. A caspase-1 cliva uma proteína citoplasmática, a gasdermina-D, gerando poros na membrana celular, permitindo a saída das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-18, com lise da célula (LIU *et al.*, 2016).

A IL-18 e IL-1 $\beta$ , ao contrário de outras interleucinas, não são secretadas pela via clássica do complexo de golgi-retículoendoplasmático, necessitando da clivagem pelo complexo do inflamassoma para serem ativadas. O conceito de inflamassoma foi descrito pela primeira vez em 2002, por Martinon e colegas, artigo esse atualmente com quase 4000 citações. Na época, já se sabia que a geração de IL-1 $\beta$  dependia da clivagem de sua proforma (pro-IL1  $\beta$ ) pela ativação da caspase-1 em

humanos ou da caspase-11 em murinos e que vários agentes microbianos, incluindo o LPS, eram capazes de ativar a caspase-1 (MARTINON *et al.*, 2002).

O inflamassoma não está restrito apenas a leucócitos, pois também é encontrado em células e tecidos não estritamente imunes, como endotélio e epitélio. Devido ao seu elevado potencial inflamatório, a ativação do complexo inflamassoma é controlada por vários mecanismos, incluindo o controle de transcrição gênica (ex.: NF- $\kappa$ B, IRFs, microRNAs), da meia vida dos seus componentes (ex.: ubiquitinação, nitrosilação) e através da inibição mediada por proteínas citosólicas (ex.: CARD8, um inibidor de NLRP3). A maioria dos componentes do inflamassoma (i.e.: *NLRP3*, *AIM2*, *CASP1*, *IL1B*) é transcrita via NF- $\kappa$ B após a ativação de receptores da imunidade inata (ex: TLRs) ou receptores de citocinas (ex.: TNFR, IL1R) (LAMKANFI e DIXIT, 2014). Tanto PAMPs quanto DAMPs podem ativar o inflamassoma através de diferentes receptores, alguns dos quais extremamente específicos, como o NLRC4 e AIM2 que reconhecem flagelina bacteriana e DNA citosólico respectivamente. O NLRP3 apresenta um mecanismo de ativação mais abrangente, com a participação de um número muito amplo de PAMPs e DAMPs, através de mecanismos indiretos (amplamente revisado por GUO, 2015). Os mecanismos demonstrados capazes de ativar o NLRP3 compreendem o efluxo de K<sup>+</sup> (mediado por toxinas formadoras de poros ou por abertura de canais iônicos, tais como o P2X7), a liberação de moléculas das mitocôndrias ou dos lisossomos (seguida a dano infeccioso ou químico das organelas) no citosol (revisado por KELLEY, 2019). Um esquema da ativação do NLRP3 é apresentado na Figura 4.

**Figura 4- Formação do complexo do inflamassoma.** A figura mostra um exemplo em que PAMPs (por exemplo uma bactéria extracelular) ou DAMPs (ROS, efluxo de potássio ou cristais) estimulam a formação do complexo do inflamassoma, ativando a caspase-1 que é capaz de clivar a pró IL-1  $\beta$ , liberando IL-1 $\beta$  madura para o meio extracelular, gerando inflamação.



Fonte: Adaptado de Abbas, 2017.

Dentro da resposta imune, o inflamassoma desempenha um papel chave na interação patógeno/hospedeiro, representando uma importante conexão entre resposta inflamatória (produção de IL-1 $\beta$  e IL-18) e resposta adaptativa (polarização de linfócitos T CD4+ para um perfil Th1 ou Th17 ou Th2). Uma eficiente ativação do complexo é considerada protetora contra diversas infecções, tanto bacterianas

quanto virais, e isso já foi demonstrado em modelos experimentais e por estudos de associação genética na população humana (BROZ e DIXIT, 2016).

Por outro lado, devido a capacidade em responder a DAMPs, o inflamassoma e suas citocinas são apontados como principais contribuidores de inflamação em doenças estéreis, tais como obesidade e doenças metabólicas, aterosclerose e doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, doença neurodegenerativas (HOFFMAN e BRODERICK, 2016; PATEL, 2017).

Apesar do mecanismo da anemia falciforme parecer estar relacionado à participação do complexo do inflamassoma, ainda há poucos estudos sobre isso. Cerqueira *et al.*, 2011, sugeriram haver participação do inflamassoma na DF, pois encontraram uma associação positiva entre IL-18 sérica e ácido úrico, além de também terem encontrado correlação de IL-18 com DHL. Em modelos experimentais, murinos BERK (homozigoto nocaute das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ - globinas de murino, que transporta uma única cópia dos transgenes ligados para as  $\alpha$  e  $\beta$ -S globinas humanas, ou seja, murinos com ~99% de HbS humana- CAIN *et al.*, 2012) exibem uma maior concentração de IL-18 plasmática (CHANTRATHAMMACHART *et al.*, 2012).

Mendonça *et al.*, 2016, encontraram valores mais elevados de DAMPs ( Heme, HSP70 and HMGB1) em pacientes AF, quando comparados a controles, além de terem visto uma maior concentração sérica de IL-18 e IL-1 $\beta$ .

Nossa busca na literatura sobre a dosagem de IL-1 $\beta$  em sangue periférico de pacientes com DF mostrou resultados controversos, provavelmente devido à metodologia utilizada. Croizat, 1994, não encontrou diferença significativa entre as concentrações em plasma de controles e pacientes, sendo que apenas dois casos de 28 analisados tinham níveis detectáveis. Por outro lado, Pathare *et al.*, 2004, encontrou  $p < 0,04$  ao comparar os níveis de pacientes em período fora de crise com controle saudável. Estudo comparando pacientes SS com e sem úlcera de perna mostrou uma mediana de concentração de IL1- $\beta$  0,34 pg/mL nos acometidos. No grupo sem lesão, os valores foram próximos a zero, com  $p = 0,0178$  (BOWERS *et al.*, 2013).

Vogel *et al.*, 2018, encontraram uma atividade maior de caspase-1 em plaquetas isoladas de pacientes com DF em período fora de crise quando comparada ao controle normal. Da mesma forma, houve diferença entre o valor

basal e valores em período de crise, em um mesmo paciente. Ademais, o plasma de pacientes DF foi capaz de gerar um aumento da regulação da expressão de caspase-1 ativada nas plaquetas dos controles.

Pitanga *et al.*, comparando PBMC de pacientes AF com controles, encontrou um nível maior de expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  e NLRP3 nos pacientes. Para caspase-1 e IL-18 não houve diferença entre os grupos.

### **2.2.1 Modificadores Genéticos e polimorfismos do inflamassoma**

Geneticamente, a HbS oferece uma vantagem evolutiva ao heterozigoto, devido à proteção à malária. Sua origem ainda é controversa, porém um artigo publicado no American Journal of Human Genetics, em 2018, usando dados do projeto 1000Genomes, mostrou que há evidências de que a mutação tenha uma origem única, com uma idade de ~7300 anos, tendo sido propagada com a migração na África. Indiretamente, esse dado questiona a importância dos haplótipos da  $\beta$ -globina, que até então eram relacionados à origem étnica, atribuindo à mutação uma origem multicêntrica (SHRIMER e ROTIMI, 2018).

Alguns marcadores genéticos já foram propostos para a doença, como a persistência da hemoglobina fetal,  $\alpha$ -talassemia e os próprios haplótipos da  $\beta$ -globina. Apesar de ser um distúrbio mendeliano clássico, a doença exibe um fenótipo multigênico. O GWAS (em tradução livre, estudos de associação ampla do genoma) tem progredido lentamente em doenças mais raras, como a AF, devido à necessidade de grandes amostras. Estudo com 1265 pacientes descreveu 40 SNPs que eram fortemente associados à gravidade clínica (OR > 1,0); desses, 32 foram analisados, sendo que 8 apresentaram efeitos consistentes, embora não tenham atingido significância estatística. Os autores concluíram que os polimorfismos genéticos que afetam o curso clínico da anemia falciforme são potencialmente úteis como marcadores prognósticos, podendo ser usados inclusive como terapêuticas personalizadas (STEINBERG e SEBASTIANI, 2012). À época desses estudos, nenhum dos genes do inflamassoma foi incluído.

Polimorfismos de nucleotídeo único são um tipo de variação genética mais comum entre pessoas e ocorrem normalmente ao longo do DNA, sendo que existem de 4 a 5 milhões de SNPs no genoma humano. As diferenças herdadas contribuem

para as variações fenotípicas, suscetibilidade a doenças e resposta ao ambiente, incluindo drogas, o que colabora, de certa forma, para a preservação da espécie e serve como ferramenta para estudos genéticos. Por conceito, um SNP deve ocorrer em uma frequência acima de 1% em humanos. Estima-se que uma pessoa comum tenha cerca de 24000 a 40000 substituições de aminoácidos, não havendo necessariamente significado clínico (CARGILL *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999 e GENETICS HOME REFERENCE, 2019).

Nosso grupo já havia demonstrado a participação do polimorfismo da IL-1 $\beta$  na DF, com um aumento de risco para osteonecrose e hipertensão pulmonar nos pacientes com IL-1 $\beta$  + 3954C > T (correspondente ao rs1143634) (VICARI *et al.*, 2015). Outro grupo, demonstrou que alelo T da IL-1 $\beta$  -511 C/T (rs16944) foi mais frequente em pacientes DF aloimunizados (SIPPERT *et al.*, 2017). Com relação aos polimorfismos do inflamassoma, estudo com 21 pacientes, na região norte do Brasil, não encontrou associação entre a gravidade da doença (Sickle Cell Disease Severity Calculator) e polimorfismos do *NLRP1*, *NLRP3*, *IL-18* e *IL-1 $\beta$*  (ALMEIDA *et al.*, 2019).

Como a DF apresenta diversas manifestações clínicas, que também podem ocorrer na população geral, ainda que por outros mecanismos, a tabela 5 mostra os estudos de associação de polimorfismos do inflamassoma em doenças gerais e manifestações clínicas semelhantes às que ocorrem na DF.

**Tabela 5- Manifestações clínicas em doenças gerais que, por outros mecanismos, também podem ocorrer em DF e estudos de associação de polimorfismos do inflamassoma.**

Manifestação clínica	Gene	SNP	Coorte (caso/controle; n)	Associação	Referência
Gota/aumento de ácido úrico	<i>NLRP3</i>	rs10754558 rs4612666 rs1539019	China (Han) (583/459)	Risco	Zhang <i>et al.</i> , 2018.
	<i>CARD8</i>	rs2043211	Europa e Nova Zelandia (1494+863)	Risco	McKinney <i>et al.</i> , 2015.
AVC isquêmico	<i>NLRP3</i>	rs10754558	China (1102/1610)	Risco	Zhu <i>et al.</i> , 2015 Continua

continuação

Manifestação clínica	Gene	SNP	Coorte (caso/controle; n)	Associação	Referência
Doença renal (nefropatia diabética)	<i>NLRP1</i>	rs2670660 rs11651270	Brasil (317)	Proteção	Soares <i>et al.</i> , 2018.
	<i>IL1β</i>	rs16944	Índia (1326/464)	Risco	Hameed <i>et al.</i> , 2018.
Osteonecrose (induzida por corticosteróides)	<i>IL1β</i>	rs2853550	China (286/441)	Risco	Yu <i>et al.</i> , 2019.





### 3.1 Modelo de estudo

O presente estudo consta de duas partes:

1. Primeira parte: estudo retrospectivo com busca de dados clínicos em prontuário e realização de estudo de polimorfismos de genes ligados aos inflamassomas nos pacientes elegíveis, tendo sido incluídos 161 casos;
2. Segunda parte: estudo transversal para estudo *in vitro*, totalizando 10 casos, com 9 controles normais.

### 3.2 Casuística

#### 3.2.1- Pacientes

Foram incluídos 161 pacientes maiores de 18 anos, com acompanhamento no ambulatório de Anemias hereditárias do Hemocentro da Escola Paulista de Medicina/ Unifesp, no período de 2008 a 2019, com eletroforese compatível com homozigose (SS) ou heterozigose S $\beta$  (S $\beta^0$ / S $\beta^+$ ) e que aceitassem mediante termo de consentimento a inclusão no estudo. Pelo fato desses pacientes não terem sido genotipados para a hemoglobina S, denominaremos fenótipo SS ou S $\beta^+$ . Para a primeira parte foram incluídos apenas pacientes com dados clínicos completos. Abaixo estão os critérios clínicos utilizados:

- Hepatopatia crônica: bilirrubina direta maior que 0,6 ou fígado palpável em exame físico ou alteração hepática ao exame de imagem;
- Nefropatia: microalbuminúria ou alteração na creatinina;
- Osteonecrose: de qualquer sítio, comprovada por exame radiológico (radiografia ou ressonância nuclear magnética);
- Ao menos um episódio de crise álgica, associada à vasooclusão, com necessidade de auxílio médico, relatada ao longo da vida;
- Síndrome torácica aguda caracterizada em prontuário como dor, febre, dessaturação e alteração no exame radiológico, ao menos um episódio ao longo da vida;
- Manifestações embólicas: trombose venosa periférica, tromboembolismo pulmonar e trombose venosa cerebral;
- Úlcera de perna prévia ou em atividade;

- AVC: incluído isquêmico ou hemorrágico;
- Priapismo: foi considerado se ao menos um episódio na vida de ereção prolongada, dolorosa. A análise estatística foi realizada separadamente.
- Retinopatia, com descrição em prontuário, incluindo achados iniciais, como tortuosidade vascular retiniana. Como a amostra foi de 60 pacientes, esses dados também foram analisados separadamente.

Usando o critério adaptado de Afenyi-Annan et al., 2008, os pacientes foram divididos segundo o número de lesões de órgãos alvo: 1) STA, 2) Lesão renal, 3) AVC, 4) Osteonecrose de qualquer sítio e 5) úlceras de perna. Cada lesão correspondia a 1 ponto. Os pacientes foram classificados em sintomas leves (0 e 1 lesões= 84 pacientes) e graves (2, 3 e 4 lesões, já que, assim como nesse estudo, não houve pacientes com 5 pontos, totalizando 77 pacientes).

Os resultados de exames laboratoriais foram retirados do prontuário, com até 6 meses de diferença da data da avaliação clínica, com paciente estável clinicamente no momento da coleta. Os exames foram realizados pelo laboratório do Hospital São Paulo/Unifesp. O Clearance de creatinina foi estimado pela fórmula do CKD-EPI.

Os dados demográficos dos pacientes são mostrados na Tabela 6.

**Tabela 6- Dados demográficos dos pacientes com doença falciforme.**

<b>Dados demográficos</b>		
<b>Idade (anos)</b>	<b>Média</b>	33,37 ( $\pm$ 10,97)
	<b>Mediana</b>	32 (19 a 76 anos)
<b>Gênero (F/M)</b>		57,8% (93)/ 42,2% (68)
<b>Fenótipo</b>	<b>S<math>\beta</math> (S<math>\beta</math>0 ou S<math>\beta</math>+) </b>	9,9% (16)
	<b>SS</b>	90,1% (145)
<b>Tratamento</b>	<b>Hidroxiuréia</b>	57,8% (93)
	<b>Transfusão crônica</b>	16,1% (26)
	<b>Sem tratamento específico</b>	26,1% (42)
<b>Óbito (n=15)</b>	<b>Idade mediana</b>	37 (25-65 anos)

Fonte: Autor.

A Tabela 7 mostra a distribuição das manifestações clínicas nos pacientes com DF.

**Tabela 7- Distribuição das manifestações clínicas de pacientes com doença falciforme SS/Sβ.**

Manifestação clínica	Presença		Ausência	
	%	n	%	n
<b>Hepatopatia</b>	21,74	35	78,26	126
<b>Nefropatia</b>	37,27	60	62,73	101
<b>Osteonecrose</b>	29,81	48	70,19	113
<b>Crise álgica</b>	78,26	126	21,74	35
<b>Síndrome torácica aguda</b>	53,42	86	46,58	75
<b>AVC</b>	19,25	31	80,75	130
<b>Manifestações embólicas</b>	9,94	16	90,06	145
<b>Úlcera</b>	18,63	30	81,37	131
<b>Retinopatia (n=60)</b>	56,7	34	43,3	26
<b>Priapismo (n=68)</b>	44,12	30	55,88	38
<b>Lesões de órgãos</b>	Manifestações Graves ( $\geq 2$ )		Manifestações Leves (0-1)	
<b>(AFENYI-ANNAN et al., 2008)</b>	47,8	77	52,2	84

Fonte: Autor.

A Tabela 8 mostra a distribuição de dados laboratoriais dos 161 participantes. Foram incluídos dados do hemograma, marcadores de hemólise e ferritina.

**Tabela 8- Características laboratoriais de pacientes com doença falciforme SS/Sβ.**

<b>Parâmetro</b>	<b>Mediana</b>	<b>Valores de referência</b>
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	9,10 (4,8-13,4)	12 -15,5
<b>Hematocrito (%)</b>	26,2(14-38,8)	35 – 45
<b>Leucocitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	8,7(3,4-20,0)	3,5 - 10,5
<b>Monócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	0,73(0,16-2,52)	0,3 - 0,9
<b>Linfócitos (x10<sup>9</sup>/L)</b>	2,8(1,05-8,46)	0,9 - 2,9
<b>Bilirrubina indireta (mg/dL)</b>	1,49(0,21-20)	0,1 – 0,6
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,6(0,3-9,52)	0,5 – 0,9
<b>Clearance de creatinina (estimado por CKD-EPI)</b>	126,5 (7,0-167)	90 – 130
<b>Ferritina (ng/ml)</b>	501(11-8000)	H:30 - 400 M:13 – 150
<b>DHL (u/L)</b>	467(141-2673)	250
<b>Ácido úrico (mg/dL)</b>	5,0(2,0-11,6)	2,4 – 5,7
<b>Reticulócitos/ µL</b>	204000 (67200-592000)	16000 - 70000

Fonte: Autor.

Para o estudo *in vitro* foi coletado o sangue periférico (cerca de 10 mL, em tubo de heparina) de 10 pacientes AF dentro da casuística apresentada que pudessem atender aos seguintes critérios:

- 1) Não apresentar infecções virais ou bacterianas nas últimas quatro semanas;
- 2) estar em período fora de crise (há mais de 3 meses);

- 3) não estar em uso de imunossupressores;
- 4) não ter diagnóstico de doença inflamatória ou neoplasia associada;
- 5) apresentar eletroforese de hemoglobinas SS.

Desta forma excluimos potenciais efeitos de confusão na interpretação dos dados da ativação do inflamassoma *in vitro*.

Os dados demográficos e clínicos principais desses pacientes são apresentados na Tabela 9.

**Tabela 9- Dados demográficos e clínicos de pacientes com AF, incluídos no teste celular.**

<b>Dados demográficos</b>	
<b>Idade média</b>	35,5 ( $\pm$ 15,4)
<b>Gênero (F/M)</b>	5/5
<b>Tratamento</b>	7
<b>Hidroxiuréia</b>	3
<b>Sem tratamento específico</b>	3
<b>Transfusão crônica</b>	4

Fonte: Autor.

Todos participantes foram incluídos voluntariamente e receberam um termo de consentimento livre e esclarecido aprovado previamente pelo comitê de ética da UNIFESP, sob o número CAAE 70891517.9.0000.5505.

### **3.2.2 Doadores saudáveis**

Foram recrutados 9 indivíduos controles do Hemocentro da UNIFESP, com faixa etária de 18 a 69 anos, com todos os requisitos básicos para a doação de sangue estabelecidos pelo Ministério da Saúde. A idade média do grupo foi de 31,3 ( $\pm$ 7,8), sendo 4 indivíduos do gênero masculino e 5 do gênero feminino.

### **3.3 Coleta da amostra e Extração de DNA:**

As amostras de 8 ml sangue total de 88 pacientes foram coletadas por punção venosa periférica, em tubos contendo anticoagulante (EDTA) e centrifugadas

a 4500 rpm por 10 minutos, em temperatura de 20° C, para retirada do *buffy coat*. Posteriormente, foi realizada a extração de DNA utilizando-se o Kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen®), no laboratório de Anemias Hereditárias da UNIFESP. Após a extração, Os DNAs foram armazenados em freezer -20°C. Além desses, 73 amostras foram utilizadas a partir do Biorrepositório BR-116, UNIFESP, sendo aplicado termo de consentimento aos pacientes com quem se tinha contato. A qualidade e a concentração do DNA foi determinada pela leitura óptica da absorbância em um equipamento de espectrofotometria (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, Wilmington, USA), sendo a concentração alvo de 50 a 100 ng/dl e grau de pureza 260/280~1,8 e 260/230~2,0. Amostras fora desse padrão foram submetidas à purificação pela técnica de extração de sais ou descartadas.

### 3.4 Seleção dos polimorfismos de base única (SNPs) nos genes do inflamassoma

Foram selecionados 10 SNPs dos genes *P2X7*, *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4*, *IL1 $\beta$*  e *IL18*, considerando dados de literatura, cujas referencias são mostradas na Tabela 10. Além disso, os SNPs escolhidos possuíam frequência do alelo menor (MAF) maior que 5%, de acordo com o banco de dados publico *1000Genome*.

**Tabela 10- Seleção de SNPs. Apresenta-se a lista de SNPs selecionados com informações como identificação, localização, frequência alélica e efeito funcional, com a respectiva citação da literatura.**

Gene	Identificação	Localização (GRCh38.p13)	Frequencia alélica (1000Genome)		Efeito funcional	Referencia
			EUR	AFR		
<b><i>NLRP1</i></b>	rs12150220	17p13.2	A=0,56 T=0,44	A=0,97 T=0,03	Aumenta o processamento de IL-1 $\beta$	Levandowski <i>et al.</i> , 2013
	rs11651270	17p13.2	T=0,54 C=0,46	T=0,52 C=0,48	Aumenta o processamento de IL-1 $\beta$	Levandowski <i>et al.</i> , 2013

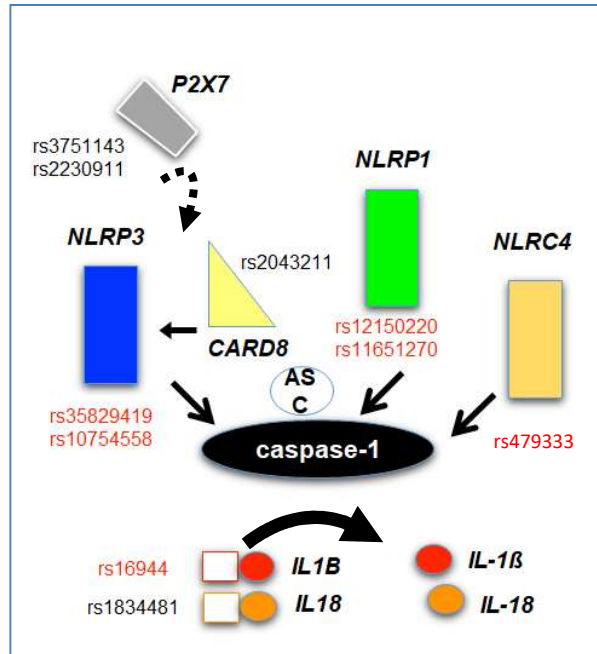
continua

continuação

Gene	Identificação	Localização (GRCh38.p13)	Frequencia alélica (1000Genome)		Efeito funcional	Referencia
<b>NLRP3</b>	rs10754558	1q44	G=0,46 C=0,54	G=0,25 C=0,75	Aumento da estabilidade do mRNA do <i>NLRP3</i>	Hitomi <i>et al.</i> , 2009.
	rs35829419	1q44	C=0,95 A=0,05	C=0,99 A=0,01	Aumento da ativação do <i>NLRP3</i> (aumento da produção de IL-1 $\beta$ e IL-18)	Verma <i>et al.</i> , 2012.
<b>NLRC4</b>	rs479333	2p22.3	C=0,38 G=0,62	C=0,33 G=0,67	Diminuição da expressão de <i>NLRC4</i> e diminuição sérica de IL-18	Matteini <i>et al.</i> , 2015 Zeller, 2015
<b>IL1B</b>	rs16944	2q14.1	A=0,35 G=0,65	A=0,57 G=0,43	Produção aumentada de IL-1 $\beta$ induzida por LPS	Hall <i>et al.</i> , 2004.
<b>IL18</b>	rs1834481	11q23.1	C=0,78 G=0,22	C=0,99 G=0,01	Redução sérica da concentração de IL-18	He <i>et al.</i> , 2010.
<b>CARD8</b>	rs2043211	19q13.33	A=0,67 T=0,33	A=0,82 T=0,18	Maior liberação de IL-1 $\beta$ , associado à gravidade da Artrite reumatóide.	Addobbati C <i>et al.</i> , 2018.
<b>P2X7</b>	rs2230911	12q24.31	C=0,92 G=0,08	C=0,85 G=0,15	A perda de função diminui a liberação de IL-1 $\beta$	Wesselius <i>et al.</i> , 2012.
	rs3751143	12q24.31	A=0,79 C=0,21	A=0,73 C=0,24	Diminui a liberação de IL-1 $\beta$ em monócitos	Sluyter <i>et al.</i> , 2004.

A Figura 5 esquematiza os SNPs usados, bem como se são ganho ou perda de função.

**Figura 5- Polimorfismos do genes relacionados ao complexo inflamassoma.** São demonstrados os polimorfismos, sendo que em vermelho encontram-se aqueles com ganho de função e em preto aqueles com perda de função.

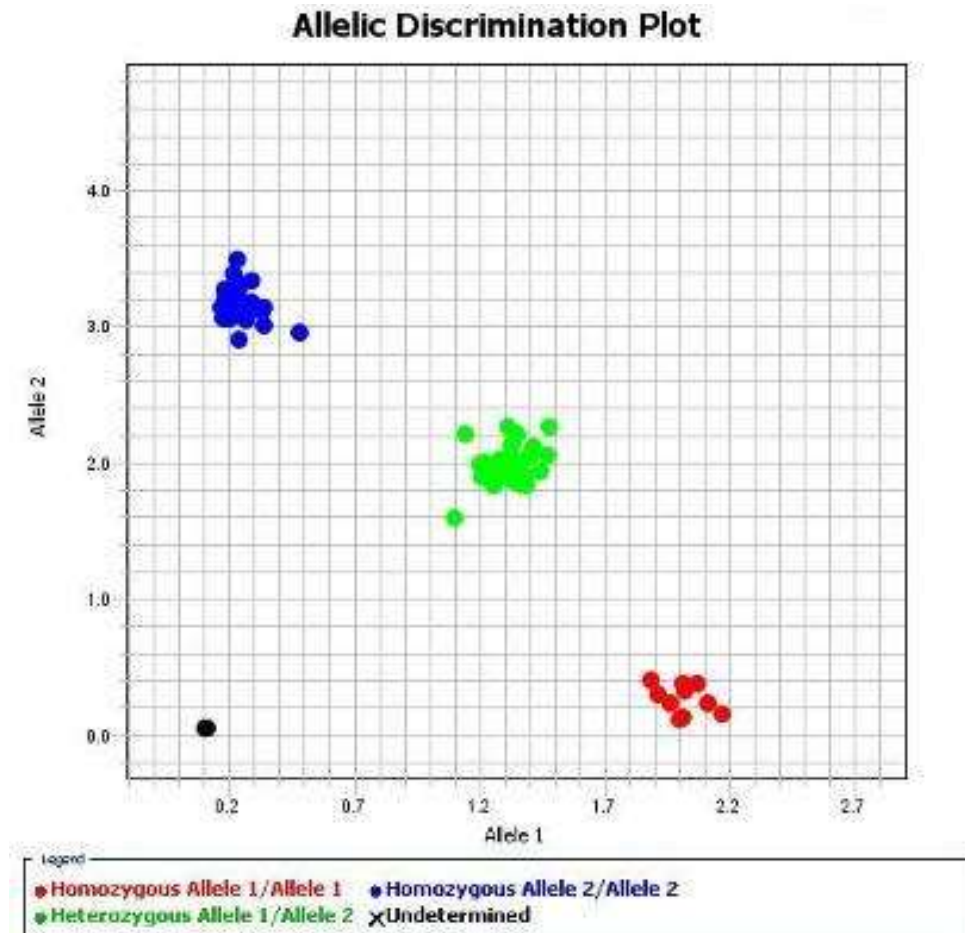


Fonte: LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA/ICB-USP, 2019.

A genotipagem dos SNPs foi efetuada com ensaios alelo-específicos de tipo TaqMan® (Applied Biosystems, Termo Fisher Scientific), e qPCR no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio 3.0 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante, no laboratório de Imunogenética, ICB/USP. O software QuantStudio™ Design Analysis (versão 1.4) foi utilizado para a discriminação alélica e obtenção dos genótipos para cada indivíduo. A figura 6 ilustra um modelo de discriminação alélica.



**Figura 6- Exemplo de discriminação alélica por um polimorfismo de base única.** Nota-se em verde os heterozigotos, em vermelho o alelo 1 e em azul o alelo 2.



Fonte: Manual QuantStudio

### 3.5 Análise da distribuição dos SNPs.

A distribuição dos SNPs foi analisada de acordo com:

- a gravidade da doença (score de gravidade),
- a letalidade,
- a presença de manifestações clínicas específicas,
- exames laboratoriais.

Para estatística, utilizamos análise multivariada e modelo geral linear (GLM), incluindo variáveis de correção como gênero, idade, fenótipo e eventualmente o tipo de tratamento utilizado, como especificado na apresentação dos resultados.

Aplicamos a correção para comparações múltiplas independentes de Bonferroni e ajustamos o nível de significância de  $p=0,05$  a  $p=0,008$  ( $0,05/6$ ), considerando que os 10 SNPs estão em 6 *loci* independentes.

O software R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) foi utilizado para a análise de associação multivariada e para obtenção de modelos de herança (package "SNP assoc" version 3.5.3). O software Haploview (BARRET *et al.*, 2005) foi utilizado para investigar o desequilíbrio de ligação (LD, do inglês "linkage disequilibrium") e para derivar os haplótipos.

### 3.6. Obtenção de monócitos e PBMC do sangue periférico

**PBMC.** As células mononucleadas de sangue periférico (PBMC, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) foram obtidas a partir da amostra de sangue total de pacientes, através do gradiente de densidade com uso de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Biosciences). O PBMC foi colocado  $1 \times 10^6$  PBMC/poço em placas de 24 poços (Corning Costar).

**Monócitos.** Os monócitos foram separados das demais PBMC por adesão em placas de cultura. Em resumo, foram distribuídos  $4 \times 10^6$  PBMC/poço em placas de 24 poços (Corning Costar). Após 2 horas de adesão a  $37^\circ\text{C}$  e 5%  $\text{CO}_2$ , os poços foram lavados com solução salina tamponada (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*; Sigma-Aldrich) por 3 vezes para remover as células não aderentes. Os monócitos aderidos no poço (cerca de 10% dos PBMC) foram mantidos em cultura até o dia seguinte em meio RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS, do inglês "Fetal Bovine Serum"; Gibco).

### 3.7 Ensaio de ativação do inflamassoma nos monócitos isolados de pacientes com AF

Os monócitos foram desafiados com  $1 \mu\text{g/mL}$  de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, *Escherichia coli* cepa O111:B4; Sigma-Aldrich) por 3 e 24 horas, e depois com  $1 \text{ mM}$  de adenosina trifosfato (ATP; Sigma-Aldrich) por ulteriores 15 minutos de acordo com o protocolo de ativação do NLRP3 inflamassoma (GATTORNO, 2007).

O sobrenadante de cultura foi coletado para dosagem das citocinas. Em alguns experimentos, as células foram pré-incubadas com 10 µg / mL de MCC-950 (Invivogen), um inibidor específico de NLRP3 (COLL et al., 2015). Também foram feitos ensaios com o inibidor CGI-1746 (5 µM), um inibidor de BTK, e partenólídeo (10 µM), um inibidor global da via do inflamassoma.

Para avaliar a ativação de outros receptores foram usados flagelina (5µg/ml), uma molécula capaz de ativar o receptor NLRC4 e valbopro (1µM), um ativador do receptor NLRP1, ambos por 3 e 24h.

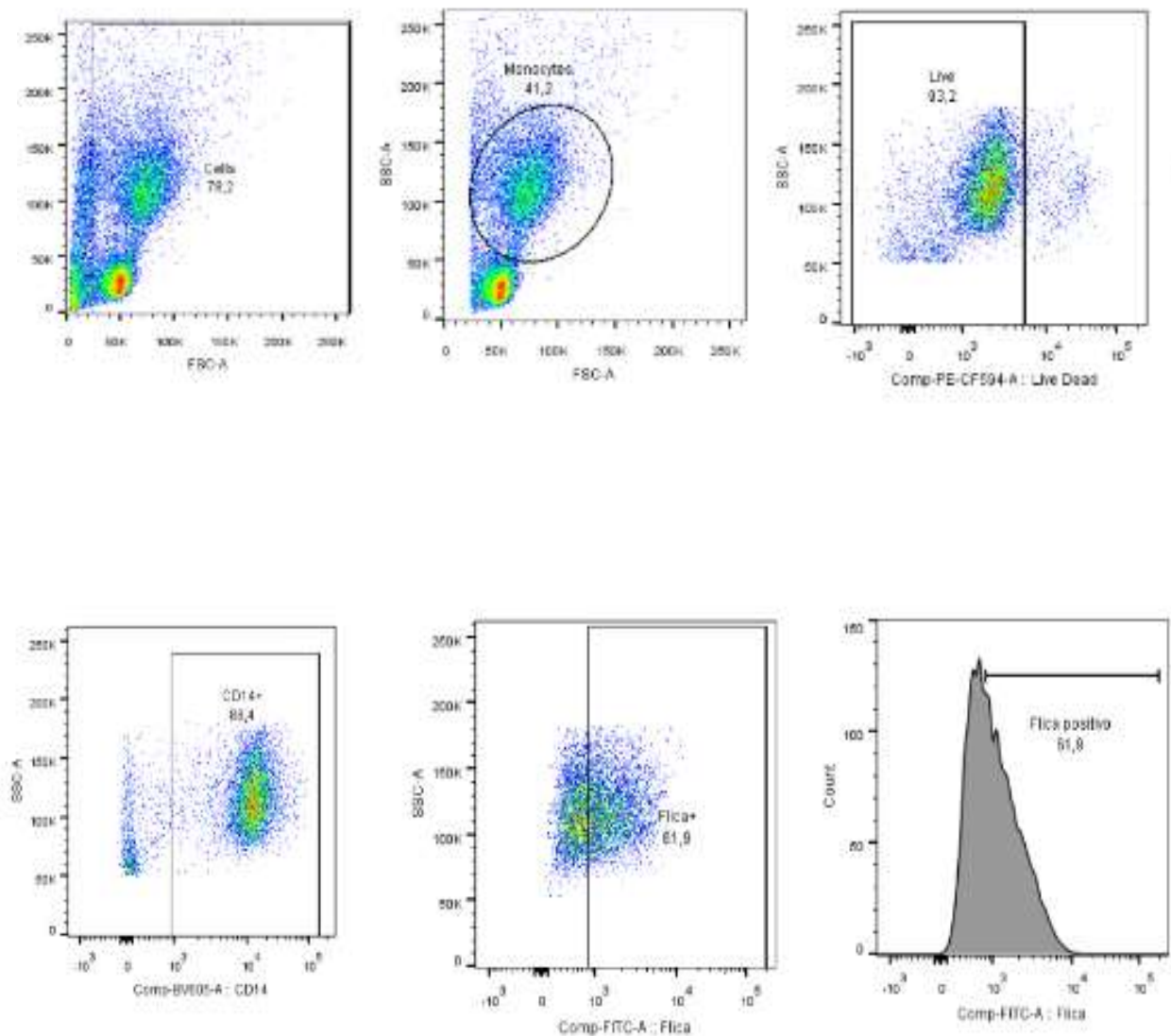
### **3.8 Avaliação da concentração de citocinas por ELISA em sobrenadante de cultura**

As concentrações de IL-1β periféricas, do sobrenadante de cultura dos monócitos e de incubação de PBMC foram determinadas por ELISA comercial de acordo com a instrução do fabricante (Human IL-1beta ELISA MAX Deluxe - BioLegend). O programa GraphPad Prism (versão 7.0) foi utilizado para analisar a natureza dos dados (paramétrico ou não paramétrico) e para testar as diferenças de concentração das citocinas nos grupos estudados. As concentrações das citocinas estão apresentadas em pg/mL.

### **3.9 Detecção da ativação de caspase-1**

Um total de  $2 \times 10^5$  de células foi marcada por 1 hora, a 37°C e a 5% de CO<sub>2</sub>, com o kit FAM-FLICA (*Immunochemistry Technologies*) de acordo com as instruções do fabricante. Após isso, a clivagem de caspase-1/ativação foi medida no citômetro LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences). Dentro do *gate* característico de tamanho e granulosidade de monócitos e linfócitos, foram adquiridos cerca de 50000 eventos utilizando-se o software DIVA® (BD Biosciences®) (Figura 7). O marcador de viabilidade Live/Dead Fixable Cell Stain Kit (Life Technology/Thermo Fisher Scientific) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. Foi feita marcação para CD 14+ ( monócitos) e CD19+ ( linfócitos). Os dados brutos obtidos foram analisados com o auxílio do software FlowJo (Tree Star) e foram apresentados como porcentagem de células positivas (%).

**Figura 7- Exemplo de avaliação da ativação da caspase-1, através da sonda fluorescente FLICA.** O histograma mostra um pico com células FLICA positivas, dentro da *gate* de monócitos (CD14<sup>+</sup>).



Fonte: LABORATÓRIO DE IMUNOGENÉTICA/ICB-USP, 2018.



#### 4.1 Análise dos SNPs selecionados para o estudo.

Foram genotipados na coorte de pacientes DF 10 polimorfismos de base única, nos genes dos receptores *NLRP1* (L155H/rs12150220, M1126V/rs11651270), *NLRP3* (Q705K/rs35829419, rs10754558 na região 3' UTR) e *NLRC4* (rs479333 na região intrônica), das citocinas *IL1 $\beta$*  (rs16944 no promotor) e *IL18* (rs1834481 em região intrônica), e de duas moléculas envolvidas na ativação do *NLRP3* (*CARD8*, *P2X7*).

A distribuição dos SNPs na coorte resultou de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p_{HW} \geq 0.05$ ) para quase todos os SNPs. O polimorfismo rs11651270 não se encontra em equilíbrio.

A Tabela 11 mostra o equilíbrio de Hardy-Weinberg, bem como as frequências do maior alelo na população estudada.

**Tabela 11- Equilíbrio de Hardy-Weinberg e frequência do maior alelo.**

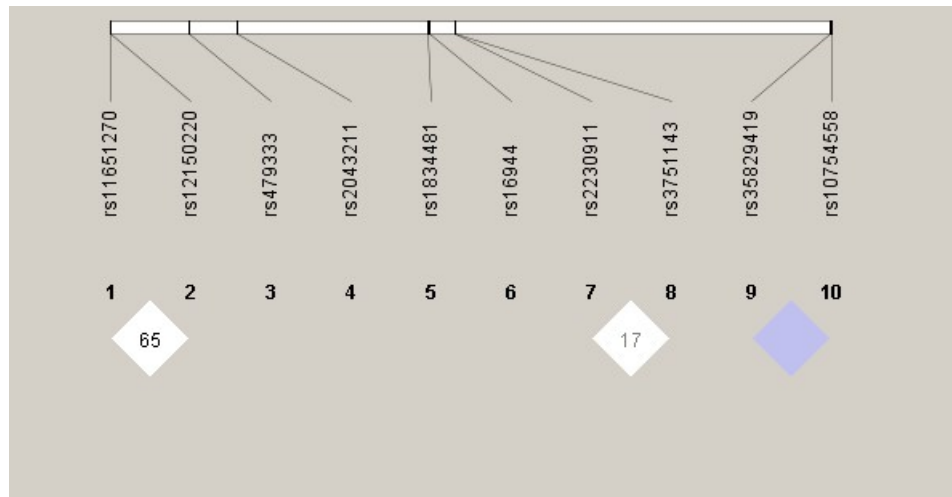
<b>Gene</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Alelos</b>	<b>Frequencia do maior alelo (%)</b>	<b>Equilíbrio de Hardy-Weinberg (p)</b>
<b><i>IL-18</i></b>	rs1834481	C/G	87,0	1,0
<b><i>NLRP3</i></b>	rs10754558	C/G	57,7	0,235
	rs35829419	C/A	97,7	1,0
<b><i>CARD8</i></b>	rs2043211	A/T	77,1	1,0
<b><i>IL-1<math>\beta</math></i></b>	rs16944	A/G	54,5	0,066
<b><i>P2X7</i></b>	rs2230911	C/G	90,0	1,0
	rs3751143	A/C	85,5	0,09
<b><i>NLRP1</i></b>	rs12150220	A/T	74,8	1,0
	rs11651270	T/C	53,2	0,027
<b><i>NLRC4</i></b>	rs479333	G/C	61,4	0,11

Fonte: Autor.

Em seguida, verificamos a existência do desequilíbrio de ligação entre os SNPs localizados no mesmo gene (*NLRP1*, *NLRP3*, *P2X7*) ou locus gênico (*NLRC4*

e *IL1 $\beta$* ). Como mostrado na Figura 8 e Tabela 12, existe um moderado desequilíbrio de ligação entre essas variantes na coorte analisada.

**Figura 8- Resultado do desequilíbrio de ligação (LD) para os SNPs analisados.**



Fonte: Autor.

**Tabela 12- Resultados da análise de desequilíbrio de ligação (LD) dos SNPs nos genes do inflamassoma.** São reportados os resultados da análise de LD entre os SNPs no mesmo gene ou no mesmo locus gênico, em termo de  $D'$  e  $r^2$ .

Gene	SNP1	SNP2	$D'$	$r^2$
<i>NLRP1</i>	rs11651270	rs12150220	0,65	0,17
<i>NLRP3</i>	rs35829419	rs10754558	0	0,02
<i>P2X7</i>	rs2230911	rs3751143	0,17	0,04

Fonte: Autor.

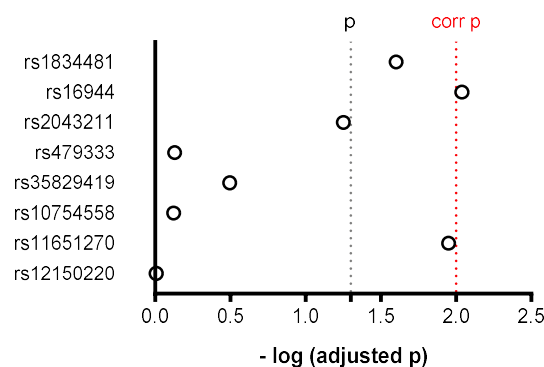
#### 4.2 Avaliação da contribuição dos SNPs selecionados na gravidade da DF

Considerando que existe uma grande heterogeneidade na apresentação clínica da DF, decidimos avaliar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica dos pacientes, considerando um escore de gravidade adaptado de Afenyi-Annan *et al.*, 2008, em que o comprometimento de 2 ou mais órgãos

classificam o paciente como grave e abaixo de 2 há um comprometimento menor, refletindo menor gravidade. Em seguida, analisamos a distribuição dos SNPs de acordo com a presença de manifestações clínicas específicas, como crises dolorosas, úlceras de perna, presença de evento embólico, hepatopatia, nefropatia, AVC e STA.

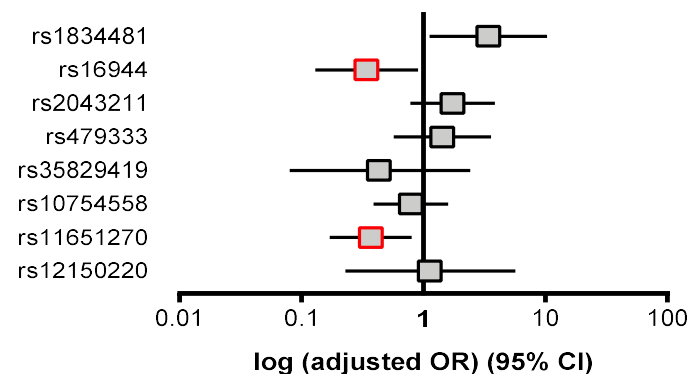
Foram incluídos na análise multivariada idade, gênero, e fenótipo como variáveis de correção. Os resultados da análise são apresentados de forma resumida na Figura 9 e 10.

**Figura 9- Associação entre os SNPs do inflamassoma e os valores de *p-value* ajustados, para o critério gravidade.** Observa-se que a o polimorfismo de IL-1 $\beta$  (rs16944) mostrou resultado estatisticamente significativo, após a correção de Bonferroni.



Fonte: Autor.

**Figura 10- Associação entre os SNPs do inflamassoma e os valores de OR e a gravidade da apresentação clínica.** Observa-se valores de OR abaixo de 1 para o rs11651270 (*NLRP1*) e rs16944 (*IL-1 $\beta$* ).



Fonte: Autor.



Dentre os polimorfismos analisados, apenas o polimorfismo rs16944, no gene IL1 $\beta$  resultou estatisticamente associado com a gravidade da DF, sendo que a homozigose AA resultou mais frequente nos pacientes no grupo leve de acordo com um modelo recessivo de herança.

A Tabela 13 mostra o resultado detalhado da análise de distribuição do SNP da IL-1 $\beta$ , rs16944.

**Tabela 13- Resultado detalhado da análise de distribuição da variante significativamente associada com a gravidade da DF.** São detalhados os resultados da análise multivariada da distribuição do SNP rs16944 de acordo com a gravidade da DF. São reportados a identificação da variante (SNP ID), o genótipo e a distribuição no grupo considerado, os valores de  $p$  ajustados por gênero, idade e fenótipo, de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC).

Gravidade						
SNP ID	Genótipo	DF grave (n=77)	DF leve (n=84)	$p_{adj}$	OR	95% IC
rs16944	G/G-A/G	58 (0,84)	52 (0,67)	0,001	0,33	0,13-0,9
	A/A	11 (0,16)	26 (0,33)			

Fonte: Autor.

A variante rs11651270 no gene NLRP1 também resultou mais frequentes nos pacientes classificados com menor gravidade (TT *versus* C/T+C/C;  $p_{aj}$ =0,01, OR=0,37, IC=0,17-0,80). Outra variante que resultou mais frequente nos pacientes graves foi a rs1834481 (C/C *versus* CG+GG;  $p_{aj}$ =0,025, OR=3,4, IC=1,12-10,28), porém em ambas essa diferença não foi estatisticamente significativa após correção de Bonferroni.

Em seguida, avaliamos um possível efeito combinatório, somatório de risco, já descrito pela literatura, entre os genótipos das variantes rs16944 e rs35829419 com relação à gravidade. Ambas as variantes resultam na ativação constitutiva do inflamassoma, sendo rs35829419 uma variação missense (Q705K) no receptor NLRP3 levando ao aumento da produção de IL-1 $\beta$  (VERMA, 2012) e rs16944 um polimorfismo promotor (-511 C> T) conhecido por aumentar a transcrição do gene IL1 $\beta$  e consequentemente, a disponibilidade de pró-IL-1 $\beta$  (HALL, 2004). Porém,

talvez pela baixa MAF da variante rs35829419 (3,3% em nosso estudo), não encontramos nenhum resultado estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

#### 4.3 Avaliação da contribuição de variantes do inflamassoma em manifestações clínicas da DF.

Ao analisar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica da DF, primeiramente, consideramos a hipótese de que o inflamassoma poderia afetar de formas diferentes as manifestações e acometimento de órgãos. Para isso, comparamos a distribuição dos 10 SNPs genotipados com a presença de diferentes formas de apresentação clínica: hepatopatia (n=35), nefropatia (n=60), osteonecrose (n=48), dor (n=126), STA (n=86), AVC (n=31), manifestações embólicas (n=16), úlcera (n=30), retinopatia (n=34) e priapismo (n=30).

Na Tabela 14 são apresentadas as manifestações clínicas e suas associações com os polimorfismos dos genes do inflamassoma. Os fenômenos embólicos e letalidade não tiveram nenhuma associação e por isso são exibidos no Anexo.

**Tabela 14- Resultados de associação dos SNPs nos genes do inflamassoma com as manifestações clínicas da DF.** Apresenta-se resumidamente a análise multivariada da distribuição dos SNPs selecionados com a presença da manifestação clínica da DF, em termo de valores de p ajustados por gênero, idade e fenótipo( $p_{aj}$ ). Em itálico,  $p < 0,05$ . Não houve  $p < 0,008$ .

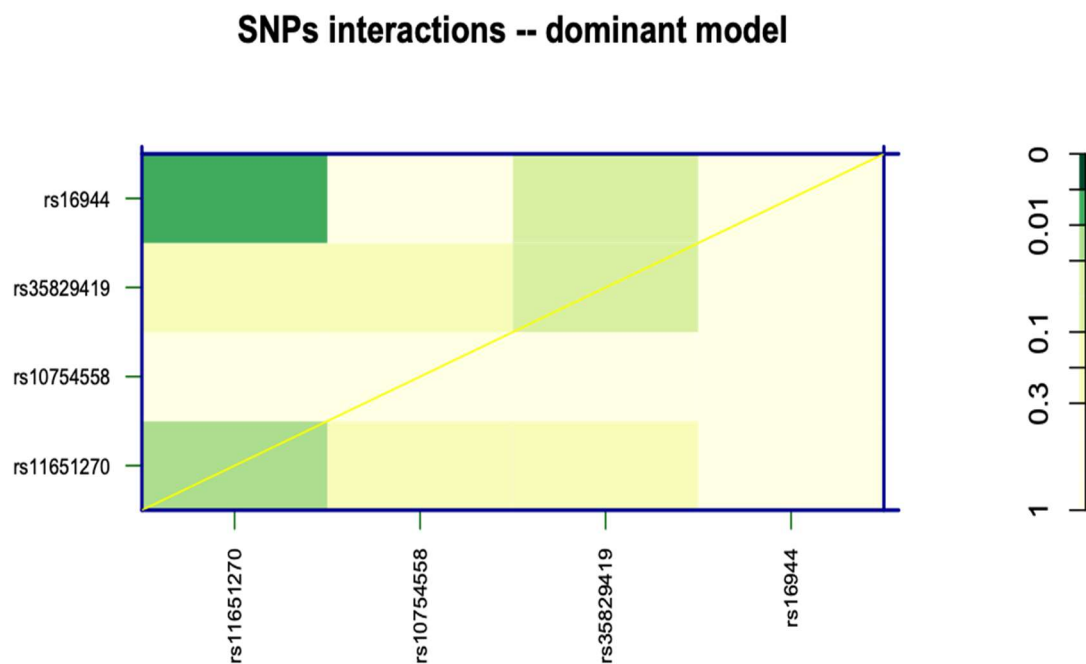
SNP-ID	Crises dolorosas (Sim:126/ Não:35)	Úlcera de perna (Sim:30/ Não:130)	ON <sup>1</sup> (Sim:48/ Não:113)	Nefropatia (Sim:60/ Não:101)	Hepatopatia (Sim:35/ Não:126)	STA <sup>2</sup> (Sim:86/ Não:75)	Priapismo (Sim:30/ Não:38)	Retinopatia (Sim:34/ Não:26)
rs12150220	0,353	0,263	0,267	0,89	0,424	0,664	0,959	0,74
rs11651270	0,488	0,486	0,572	0,76	0,023	0,193	0,143	0,011
rs10754558	0,909	0,155	0,26	0,762	0,683	0,801	0,369	0,667
rs35829419	0,057	0,774	0,206	0,025	0,335	0,195	0,095	0,255
rs479333	0,15	0,92	0,71	0,38	0,86	0,75	0,74	0,89
rs2043211	0,446	0,172	0,531	0,811	0,552	0,345	0,264	0,321
rs16944	0,019	0,441	0,01	0,86	0,865	0,0196	0,028	0,922
rs1834481	0,319	0,053	0,127	0,369	0,047	0,358	0,469	0,354
rs2230911	0,265	0,131	0,514	0,181	0,795	0,597	0,827	0,794
rs3751143	0,42	0,388	0,294	0,922	0,564	0,026	0,781	1

1 – ON: osteonecrose; 2- STA: síndrome torácica aguda

Fonte: Autor.

Quando avaliados os pacientes com hepatopatia, ajustados para idade, gênero e fenótipo houve interação entre os SNPs rs16944 e rs11651270 (rs16944A/G:rs11651270C/T), com  $p=0,003$ . Esses dados são apresentados na Figura 11.

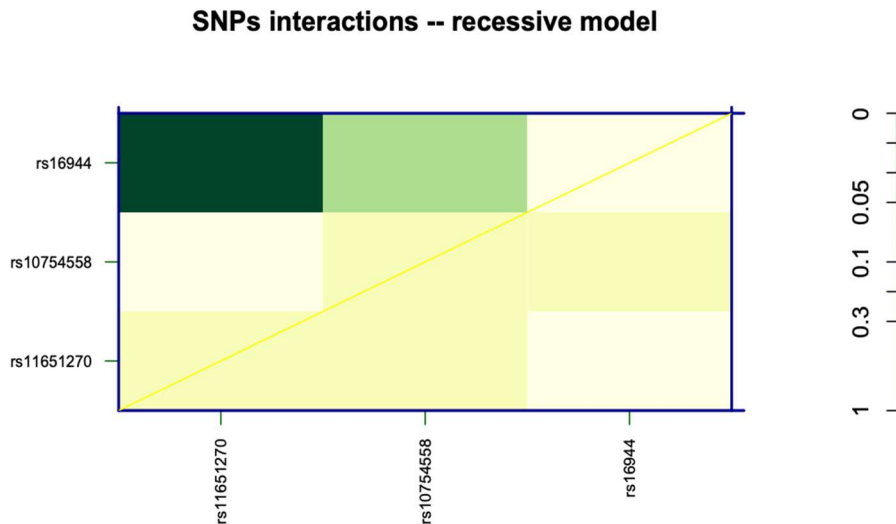
**Figura 11- Interação entre SNPs no modelo dominante quando considerada a variável hepatopatia.** Nota-se uma interação entre o rs16944 (*IL1 $\beta$* ) e o rs11651270 (*NLRP1*)



Fonte: Autor.

Da mesma forma, quando avaliados os pacientes com nefropatia, ajustados para gênero, idade e fenótipo, houve interação entre os SNPs rs16944 e rs11651270 (rs16944A/G:rs11651270C/C), com  $p=0,037$ . Esses dados são apresentados na Figura 12.

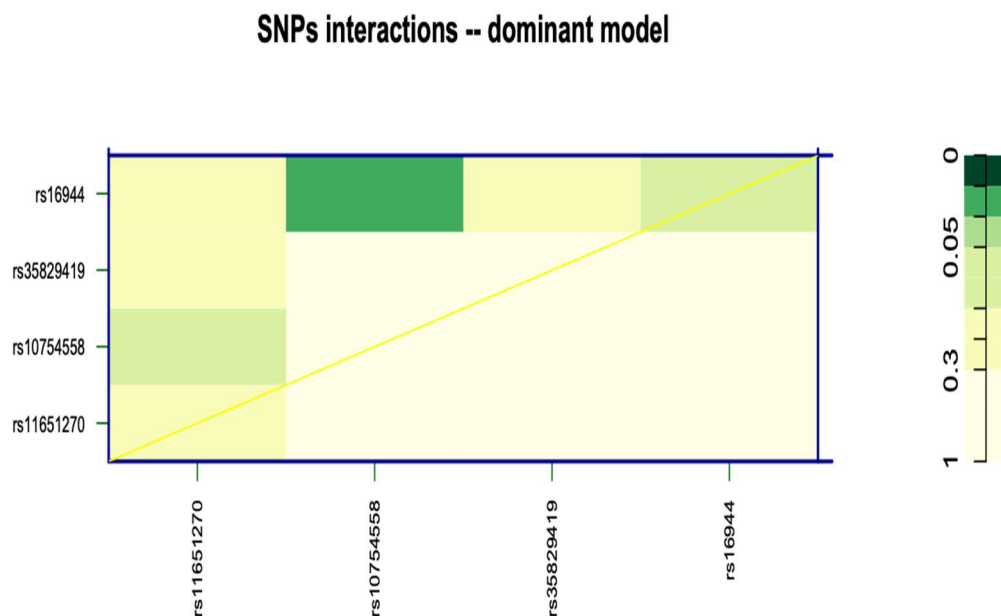
**Figura 12- Interação entre SNPs no modelo recessivo quando considerado a variável nefropatia.** Nota-se uma associação entre o rs16944 (*IL-1 $\beta$* ) e o rs11651270(*NLRP1*).



Fonte: Autor.

Quando avaliadas as interações de SNPs no AVC, houve interação entre o rs16944 e o rs10754558 (rs16944A/G:rs10754558G/G) com  $p=0,0135$ , conforme mostra a Figura 13.

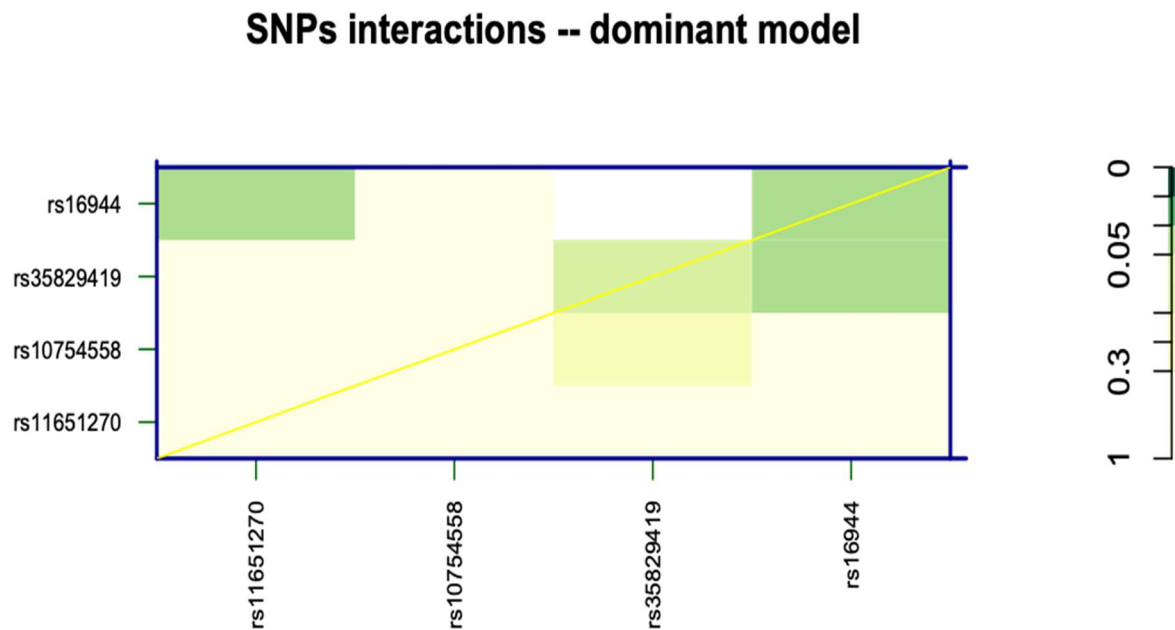
**Figura 13- Interação entre o rs16944 e o rs10754558, na manifestação clínica AVC.** Nota-se interação entre o rs16944 (*IL-1 $\beta$* ) e o rs10754558 (*NLRP3*).



Fonte: Autor.

Quando avaliadas as interações de SNPs com a presença de evento doloroso, houve interação entre o rs16944 e o rs11651270 (rs16944A/G:rs11651270C/C) com  $p=0,014$ , conforme mostra a Figura 14.

**Figura 14- Interação entre o rs16944 e o rs11651270, na manifestação clínica dor.** Nota-se interação entre o rs16944 (*IL-1 $\beta$* ) e o rs11651270 (*NLRP1*).



Fonte: Autor.

#### 4.4 Avaliação da contribuição de variantes do inflamassoma nos níveis de leucócitos

Ao analisar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica da DF, consideramos a hipótese de que o inflamassoma poderia também afetar os níveis de leucócitos e esses dados são mostrados na Tabela 15.

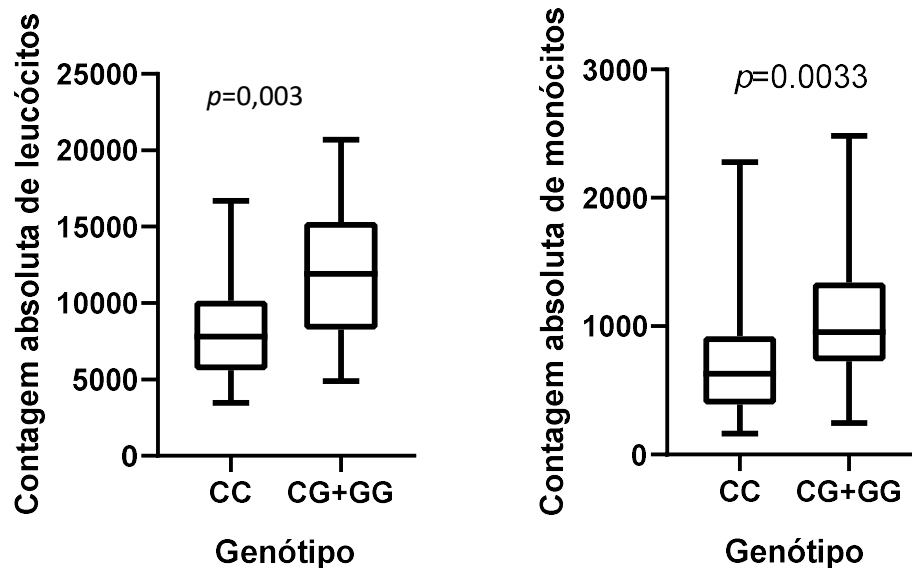
**Tabela 15- Associação entre dados do leucograma e os SNPs de polimorfismo do inflamassoma.** São reportados resumidamente os resultados da análise multivariada da distribuição dos SNPs selecionados de acordo com os níveis de leucócitos. Em destaque laranja são indicados os valores de  $OR > 1$ . Em itálico são indicados os valores de  $p \leq 0,008$ , em negrito são indicados  $p < 0,05$ . SNP-ID: identificação do SNP.

SNP ID	Leucocitose (Sim/Não)	Contagem de leucócitos	Linfocitose (Sim/Não)	Contagem de linfócitos	Monocitose (Sim/Não)	Contagem de monócitos
rs12150220	0,792	0,826	0,563	0,566	0,914	0,715
rs11651270	0,582	0,695	0,242	0,264	0,858	0,911
rs10754558	0,961	0,822	0,800	0,610	0,705	0,811
rs35829419	0,348	0,164	<i>0,003</i>	<b>0,046</b>	0,613	0,872
rs47933	0,347	0,889	0,719	0,877	0,709	0,787
rs2043211	0,186	0,289	0,518	0,888	<b>0,043</b>	<b>0,035</b>
rs16944	0,715	0,867	0,789	0,933	0,485	0,173
rs1834481	<b>0,039</b>	<i>0,003</i>	0,191	0,678	<b>0,013</b>	<i>0,003</i>
rs2230911	0,146	0,412	0,521	0,529	<b>0,028</b>	0,173
rs3751143	0,351	<b>0,015</b>	0,162	0,364	<b>0,017</b>	<i>0,0006</i>

Fonte: Autor.

Para a análise dos dados laboratoriais foi feita correção para gênero, idade e fenótipo para valores de leucócitos e monócitos. Em ambos houve associação com o rs1834451 (*IL-18*). Os resultados são apresentados na Figura 15. Quando foi realizada a análise considerando a presença ou ausência de leucocitose  $p=0,039$  ( $OR=4,45$ ;  $IC=1,47-13,43$ ) para o portador de ao menos um alelo G. Encontrou-se resultado similar para a presença ou ausência de monocitose  $p=0,013$  ( $OR=3,68$ ;  $IC=1,25-10,90$ ), também no portador de ao menos um alelo G.

**Figura 15- Associação de valores absolutos de leucócitos e monócitos com o rs1834451 (IL-18).** Nota-se uma associação com os valores absolutos de monócitos e de leucócitos. São mostrados os genótipos associados.



Fonte: Autor.

#### 4.5 Avaliação da contribuição de variantes do inflamassoma nos dados laboratoriais de pacientes com DF.

Ao analisar a contribuição da genética do inflamassoma na apresentação clínica da DF, também consideramos a hipótese de que o inflamassoma poderia afetar de forma diferente esses pacientes, influenciando, inclusive, nos dados laboratoriais. Portanto, comparamos a distribuição dos 10 SNPs genotipados com resultados de dados laboratoriais.

Na tabela 16 é mostrada a associação entre os polimorfismos do inflamassoma e os parâmetros laboratoriais relacionados à hemólise, além da ferritina. A associação com o valor de ácido úrico não mostrou significância estatística,  $p > 0,05$ .

**Tabela 16- Associação entre os SNPs de polimorfismo do inflamassoma, dados laboratoriais relacionados à hemólise e ferritina.** Com destaque em azul encontram-se  $OR < 1$  e em laranja  $OR > 1$ . Em itálico são indicados os valores de  $p \leq 0,008$ , em negrito são indicados  $p < 0,05$ . SNP-ID: identificação do SNP.

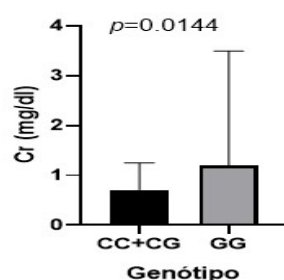
SNP ID	Nível de Hb (g/dl)	Nível de Ht (%)	Contagem de Reticulócitos (/ $\mu$ L)	Bbi (mg/dL)	Ferritina (ng/ml)	DHL (u/L)
rs12150220	0,188	0,316	0,382	0,533	0,183	0,703
rs11651270	0,905	0,852	0,953	0,187	<b>0,009</b>	0,561
rs10754558	0,188	0,238	<b>0,014</b>	0,363	<b>0,022</b>	0,498
rs35829419	0,764	0,959	0,811	0,291	0,270	0,043
rs47933	0,669	0,59	0,854	0,50	0,41	0,867
rs2043211	0,548	0,519	0,383	0,742	0,561	0,655
rs16944	0,297	0,527	0,803	0,231	<i>0,002*</i>	0,098
rs1834481	0,979	0,893	0,604	0,935	0,317	0,620
rs2230911	0,633	0,606	0,530	0,766	0,442	0,744

\*Cálculo realizado a partir do logFerritina

Fonte: Autor.

Para a variável creatinina foi feita a correção por gênero, idade, fenótipo e transfusão, já que pacientes com creatinina mais alta estão mais expostos à necessidade transfusional. A figura 16 mostra esse resultado.

**Figura 16- Associação entre valores de creatinina e o rs10754558 (NLRP3).** A homozigose GG foi mais frequente em níveis mais altos de creatinina.

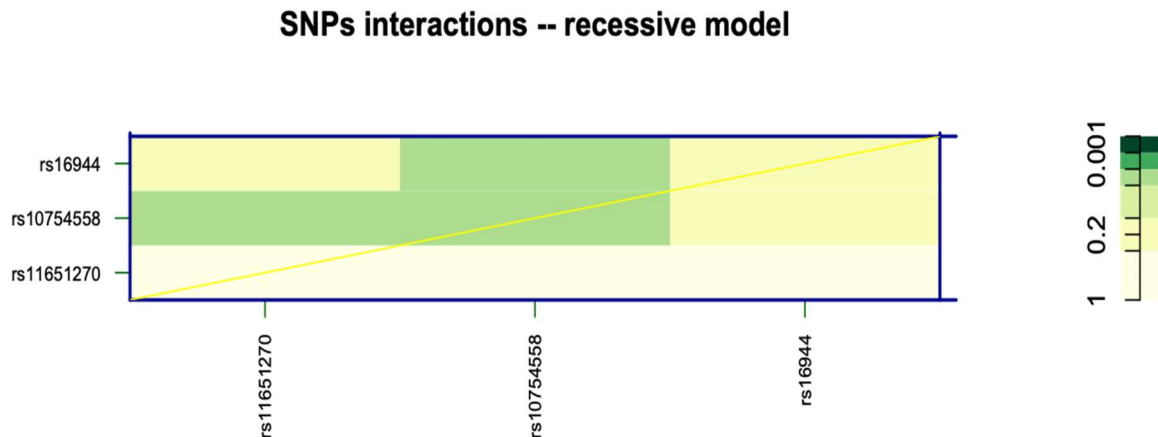


Fonte: Autor.



Mantendo a variável e correções, foi feita interação entre os SNPs rs16944 e rs11651270 (rs10754558G/G:rs16944A/A, com  $p=0,01279$ ), conforme mostrado na Figura 17, sendo que ambos são polimorfismos relacionados ao ganho de função.

**Figura 17- Interação entre os SNPs rs16944 e rs10754558, quando avaliada a variável creatinina.** Nota-se uma interação entre o rs16944 (*IL-1 $\beta$* ) e rs10754558 (*NLRP3*).



Fonte: Autor.

A variável clearance de creatinina estimada (CKD-EPI) foi corrigida apenas pelo fenótipo, porém apesar de ser um resultado com significado estatístico com o rs479333 e rs11651270, os grupos estavam dentro de uma mesma classe clínica, ou seja, valores normais. O resultado é mostrado no Tabela 15.

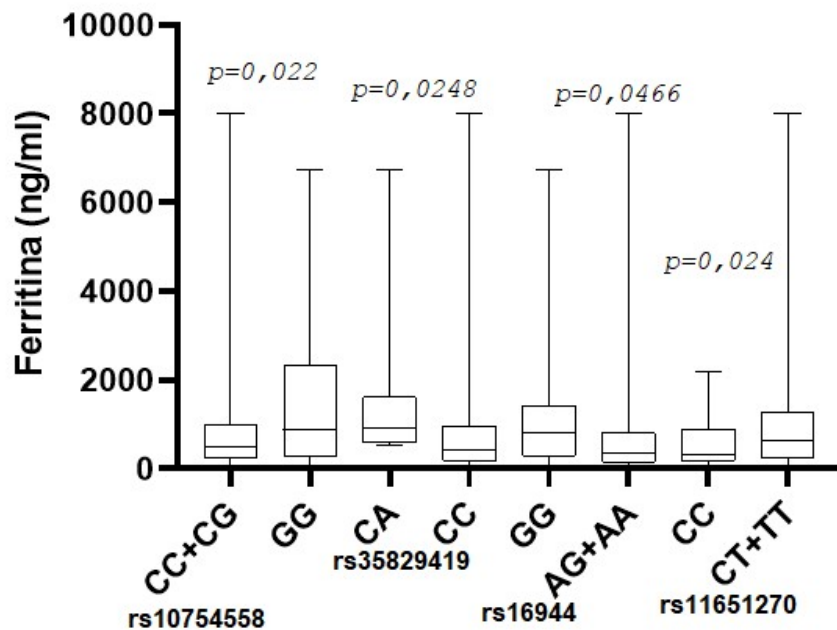
**Tabela 17- Resultados de associação com o clearance da creatinina.** Nota-se que os valores estão dentro da normalidade, com os grupos rs11651270 (T/T+C/T) e rs 479333, com tendência à hiperfiltração.

Identificação do SNP	Genótipo	Valor do Clearance	Significância estatística
rs479333	G/G+C/C	121,9	$p=0,02898$
	C/G	106,9	
rs11651270	T/T+CT	124,8	$p=0,01103$
	C/C	115,4	

Fonte: Autor.

A variável ferritina foi corrigida por gênero, idade, fenótipo e transfusão. Os resultados são mostrados na Figura 18. Na correção pelo log da ferritina,  $p=0,002$  em associação com o rs16944, conforme já mostrado em tabela anterior.

**Figura 18- Associação entre ferritina e polimorfismos do gene do inflamassoma.**



O resultado detalhado da análise de distribuição de variantes e gravidade da DF associadas ao gene da P2X7, rs3751143, é mostrado em anexos, pois, apesar de ter tido significância estatística, haviam apenas 2 pacientes em um grupo, o que não nos fez considerá-lo como clinicamente importante.

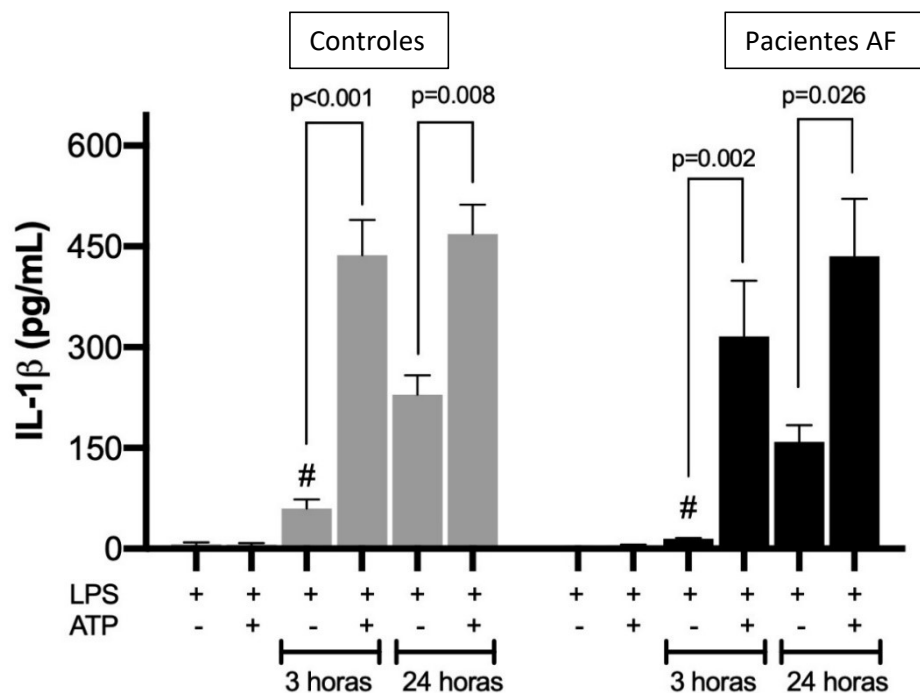
#### **4.6 Análise funcional do inflamassoma em pacientes com AF**

Uma vez que demonstramos que a genética do inflamassoma pode contribuir com a gravidade ou manifestações clínicas da AF, e, com o objetivo de verificar uma possível alteração periférica do inflamassoma nesses pacientes, decidimos investigar a ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes, desafiados com o protocolo clássico de estimulação do NLRP3 (LPS e ATP) (GATTORNO, 2007). Avaliamos a produção da citocina IL-1 $\beta$  e a ativação da caspase-1.

#### **4.7 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes AF**

Os monócitos isolados de 7 pacientes AF e 7 indivíduos controles foram estimulados com 1  $\mu$ g/mL LPS por 3 e 24 horas e com 1 mM ATP por mais 15 minutos. A figura 19 mostra os dados de produção da citocinas IL-1 $\beta$ .

**Figura 19. Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com AF (n=7) e controles (n=7), estimulados com 1 $\mu$ g/mL LPS por 3 e 24 horas na presença ou não de 1mM de ATP por 15 minutos. A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo teste de *Wilcoxon*, não paramétrico, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



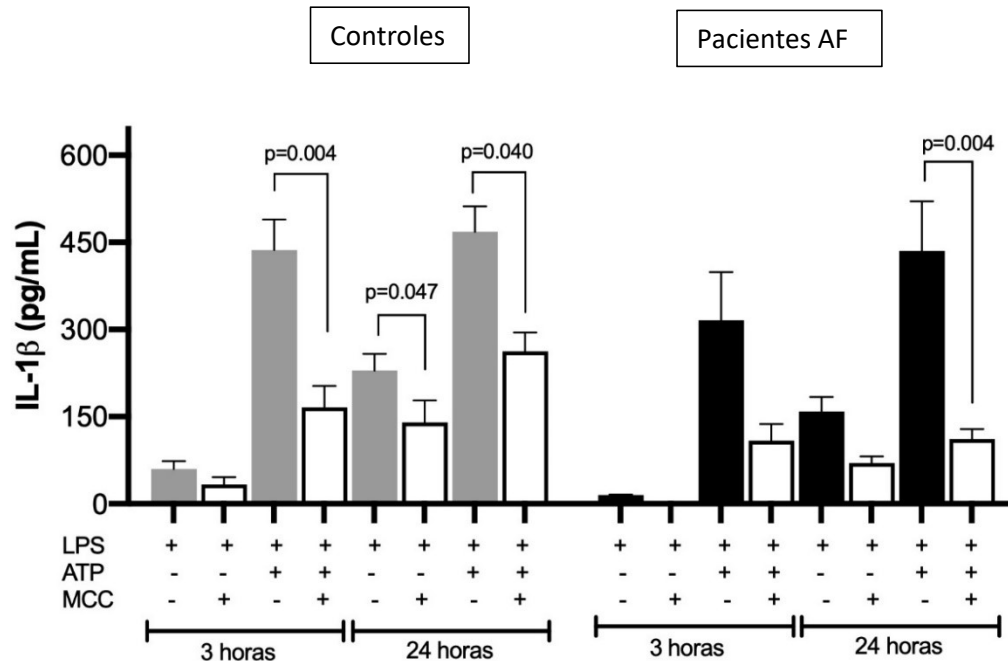
Fonte: Autor.

Podemos observar que o LPS induz à produção de IL-1 $\beta$  após 3 horas de estimulação tanto nos controles quanto nos pacientes, assim como após 24 horas de estímulo (Figura 19). Porém, a produção de IL-1 $\beta$  nas células estimuladas resultou estatisticamente mais baixa no grupo de pacientes comparado com os controles ( $p < 0,05$ ) apenas nas 3 horas de estímulo com LPS.

#### 4.8 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em monócitos de pacientes AF, utilizando a molécula inibidora MCC-950.

A fim de se identificar se havia inibição do NLRP3 inflamassoma e como se o comportava o grupo paciente com relação ao controle saudável, foi feito um desafio utilizando a molécula inibidora MCC-950. O resultado é mostrado na Figura 20.

**Figura 20. Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis, inibidos com a molécula MCC-950.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com AF (n=7) e controles (n=7), estimulados com 1 $\mu$ g/mL LPS por 3 e 24 horas na presença ou não de 1mM de ATP por 15 minutos e da molécula MCC-950. A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo teste de *Wilcoxon*, não paramétrico, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



Fonte: Autor.

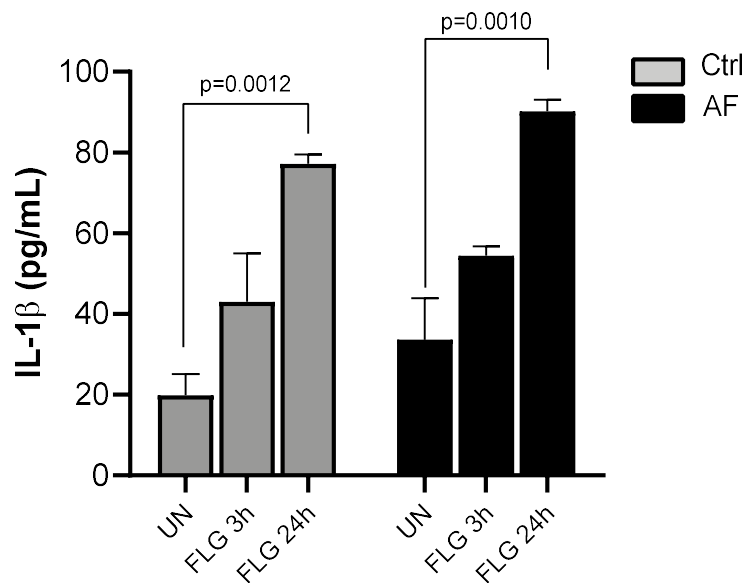
A comparação entre o grupo paciente e controle com a inibição de MCC não mostrou resultado estatisticamente significativo. Em porcentagem, no grupo controle houve 32% de redução dos valores de IL-1 $\beta$  com LPS de 3h não havendo diferença significativa. Já para o LPS de 3h + ATP, LPS de 24h, LPS+ ATP de 24 h, houve uma redução respectivamente de 62%, 39% e 48%, com significância estatística. No grupo pacientes, apenas houve significado estatístico para a inibição com LPS 24h + ATP, com uma redução de 74% do valor de IL-1 $\beta$ .

#### 4.9 Análise da produção de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis estimulados com flagelina e valbopropro.

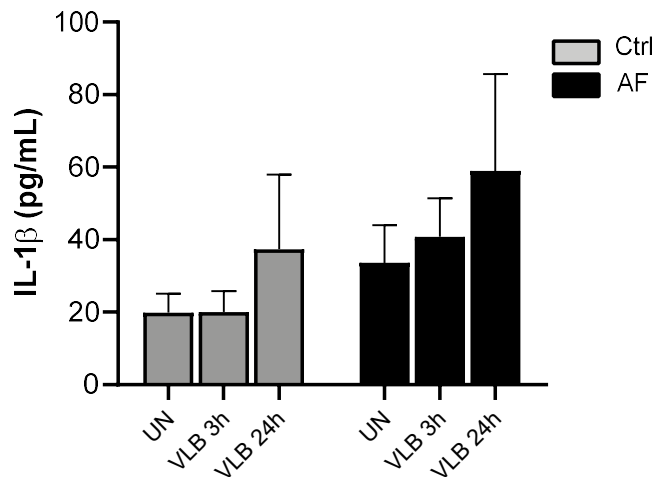
A fim de se avaliar a produção de IL-1 $\beta$  através de outros receptores do inflamassoma, fizemos um desafio celular em monócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com AF, utilizando flagelina, uma molécula capaz de ativar NLRC4, e

valbopropro, um ativador do NLRP1. Os resultados são mostrados nas Figuras 21 e 22.

**Figura 21. Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis estimulados com flagelina.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com AF (n=2) e controles (n=3), estimulados com flagelina (5 $\mu$ g/ml) por 3 e 24 horas . A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada por *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



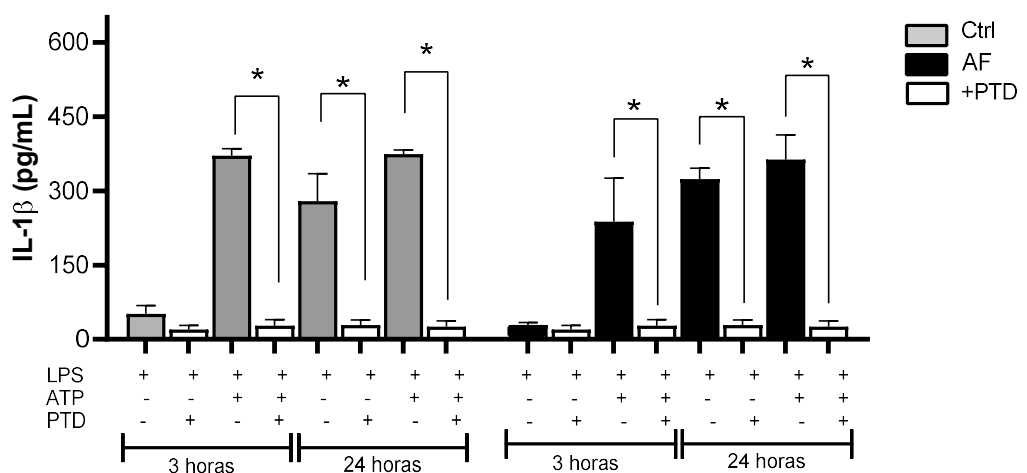
**Figura 22. Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis estimulados com valbopropro.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com AF (n=2) e controles (n=3), valbopropro (1 $\mu$ M ) por 3 e 24 horas . A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo teste de *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



#### 4.10 Análise da inibição de IL-1 $\beta$ em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis usando partenólídeo.

Também fizemos inibição com o partenólídeo, um inibidor global do inflamassoma, em monócitos de controles e pacientes. A Figura 23 mostra os resultados. Houve inibição da produção de IL-1 $\beta$  em ambos os grupos.

**Figura 23. Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF e indivíduos saudáveis inibidos com partenolideo.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de monócitos de pacientes com AF (n=2) e controles (n=3), inibidos por partenolideo (10 $\mu$ M) por 3 e 24 horas. A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada por *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.

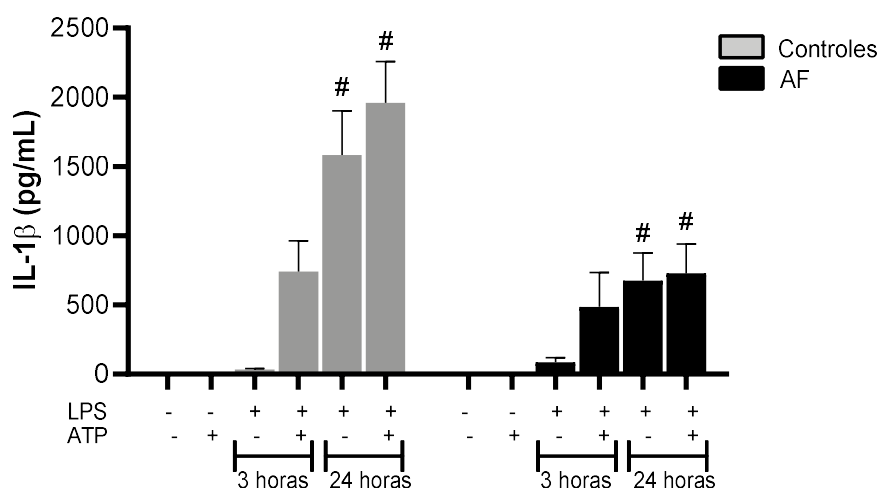


Fonte: Autor

#### 4.11 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em PBMC de pacientes AF

A fim de se identificar se havia inibição do NLRP3 inflamassoma e como se o comportava o grupo paciente com relação ao controle saudável, foi feito um desafio utilizando-se também PBMC, que, além de monócitos, possui linfócitos. O resultado é mostrado na Figura 24. Quando comparados os dois grupos, nota-se uma resposta menor no grupo de pacientes falciformes, havendo significado estatístico no LPS e LPS+ATP de 24h.

**Figura 24- Produção de IL-1 $\beta$  em PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com AF.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de PBMC de pacientes com AF (n=7) e controles (n=7), estimulados com 1 $\mu$ g/mL LPS por 3 e 24 horas na presença ou não de 1mM de ATP por 15 minutos. A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo teste de *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.

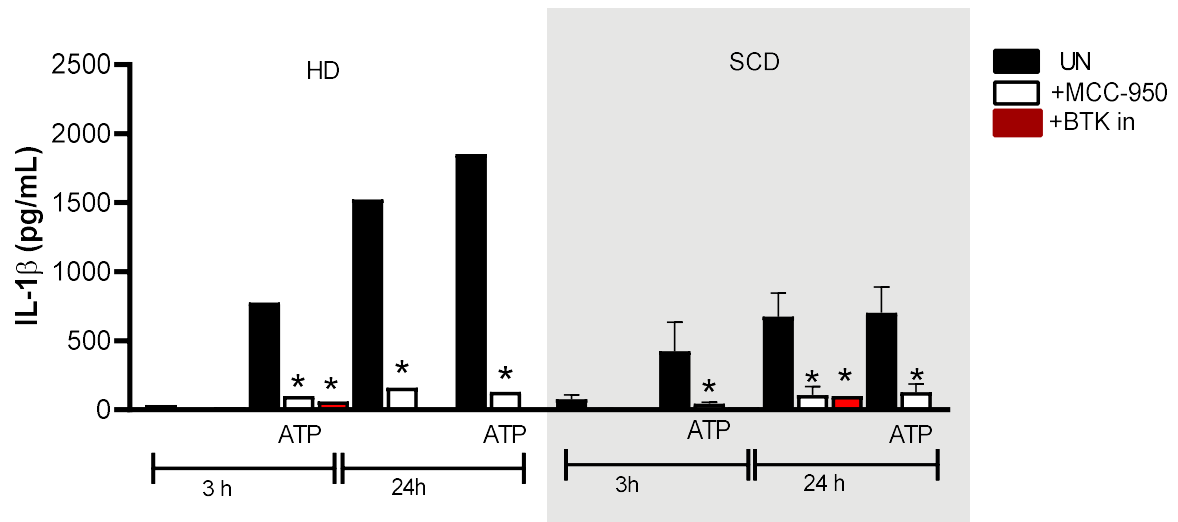


Fonte: Autor.

#### 4.12 Análise da ativação do NLRP3 inflamassoma em PBMC de pacientes AF, utilizando a molécula inibidora MCC-950.

A fim de se identificar se havia inibição do NLRP3 inflamassoma e como se o comportava o grupo paciente com relação ao controle saudável, foi feito um desafio utilizando as moléculas inibidoras MCC-950 e CGI-1746. O resultado é mostrado na Figura 25.

**Figura 25. Produção de IL-1 $\beta$  em PBMC de pacientes com AF e indivíduos saudáveis inibidos com CGI-1746 e MCC-950.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de PBMC de pacientes com AF e controles, CGI-1746 (5 $\mu$ M ) por 3 e 24 horas . A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo *Mann-Whitney*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



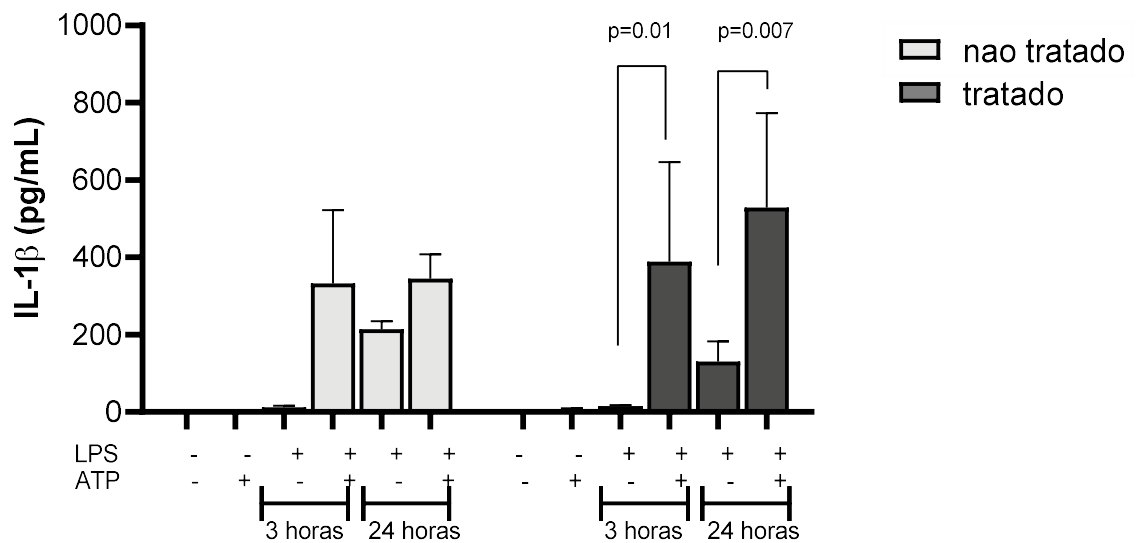
Fonte: Autor.

#### 4.13 Comparação no grupo falciforme entre pacientes tratados e não tratados.

Para avaliar se havia diferença entre o grupo de pacientes, dividimo-os em tratados e não-tratados. O resultado para monócitos e PBMC é mostrado nas Figuras 26 e 27.

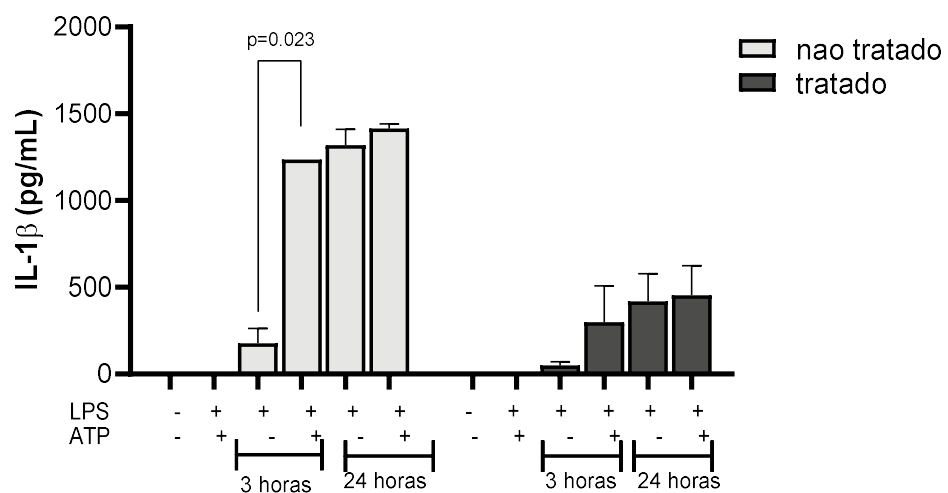
**Figura 26- Produção de IL-1 $\beta$  em monócitos de pacientes com AF, comparando indivíduos tratados e não tratados.** Concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de monócitos de pacientes com AF (n=7), divididos entre tratados (n=5) e não tratados (n=2). A análise da diferença na produção de IL-1 $\beta$  entre os grupos foi executada pelo *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.





Fonte: Autor.

**Figura 27- Produção de IL-1β em PBMC de pacientes com AF, comparando indivíduos tratados e não tratados.** Concentração de IL-1β no sobrenadante de PBMC de pacientes com AF (n=7), divididos entre tratados (n=5) e não tratados (n=2). A análise da diferença na produção de IL-1β entre os grupos foi executada pelo *Wilcoxon*, não paramétrico pareado, *p-value* <0,05 foi considerado significativo.



Fonte: Autor.

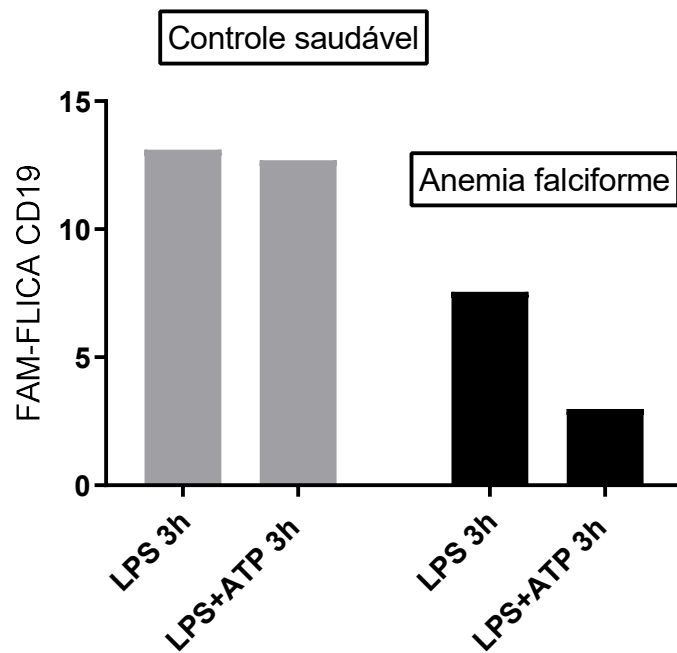
Apesar do número pequeno (n=2), o grupo não tratado apresentou uma maior produção de IL-1 β no PBMC, assemelhando-se mais ao controle normal.

#### 4.14 Análise da ativação da caspase-1, utilizando-se o método FAM-FLICA.

Para tentar complementar nossos achados, foi medida a atividade da caspase-1, em PBMC, através de citometria de fluxo (FAM- FLICA), com *gate* para

monócitos (CD14<sup>+</sup>) e linfócitos (CD19<sup>+</sup>). Foi incluído 1 paciente, em uso de hidroxiuréia. Os resultados são mostrados na Figura 28 e Figura 29.

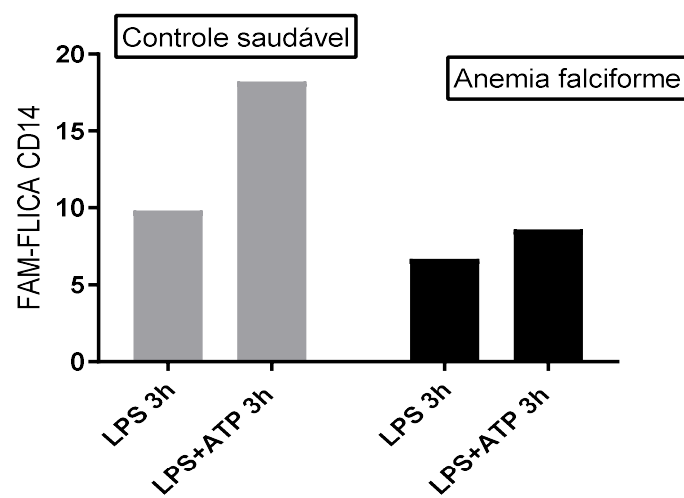
**Figura 28- Ativação de caspase-1 em linfócitos (CD19<sup>+</sup>) de PBMC de indivíduo controle e paciente AF (n=1).** Observa-se que o paciente apresentou resultado menor em 3h quando estimulado com LPS e LPS+ATP.



Fonte: Autor.

Concordando com nossos achados anteriores, houve menor ativação de caspase-1 no linfócito do paciente, tanto no sobrenadante não estimulado como no estimulado com LPS/ LPS+ATP de 3h.

**Figura 29. Ativação de caspase-1 em monócitos (CD14<sup>+</sup>) de indivíduo controle e paciente AF (n=1).** Observa-se que o paciente apresentou resultado menor em 3h quando estimulado com LPS e LPS+ATP.



Fonte: Autor.

Não foi detectada IL-1 $\beta$  em sangue periférico de pacientes e controles.





A DF é uma doença genética com base molecular explicada e que, com a maior sobrevivência desses pacientes, tem-se conhecido mais as comorbidades, a participação da inflamação e outros possíveis marcadores genéticos envolvidos. Em nosso estudo, 78,13% dos pacientes estavam em tratamento e 47,8% apresentaram acometimento de pelo menos dois órgãos.

A hepatopatia crônica esteve presente em 21,74% dos pacientes. Shah *et al.*, 2017, citam que o sistema hepatobiliar pode estar envolvido em 10-40% dos casos de DF, mas a classificação de doença varia na literatura. Nessa revisão, incluíram como hepatopatia crônica: sobrecarga de ferro, hepatites virais, litíase e colangiopatia, critérios diferentes dos nossos.

O acometimento renal ocorreu em 37,27% de nossa amostra, sendo que na literatura a frequência é de 16–27% em pacientes pediátricos, com idade de início de 23,1 anos (ONALIRAN *et al.*, 2019). Guasch *et al.* encontraram albuminúria em 68% dos 300 pacientes adultos com DF sendo que 26% deles apresentavam macroalbuminúria.

Osteonecrose ocorreu em 29,81% dos pacientes. Adesina *et al.*, 2017, em sua coorte com osteonecrose quadril encontrou uma frequência de 22% (n = 1356), com idade média de diagnóstico de 27 anos. Nossa frequência, um pouco mais alta, justifica-se pela inclusão de pacientes com osteonecrose de outros sítios, como ombro.

A presença de pelo menos um episódio de dor, com necessidade de auxílio médico, foi a manifestação mais frequente, ocorrendo em 78,26% dos casos., estando de acordo com a literatura em que a dor é a principal causa de procura ao pronto socorro e de internação (SHAPIRO *et al.*, 1997)

Síndrome torácica aguda ocorreu em 53,42% dos casos. O estudo prospectivo “Estudo cooperativo de Doença Falciforme” acompanhou 3751 pacientes por dois anos e identificou uma incidência de 29% de STA (CASTRO *et al.*, 1994). Nossa incidência maior, justifica-se pelo uso do critério de ao menos um episódio na vida.

Manifestações embólicas (TVP/TEP/TVC) ocorreram em 9,9% da nossa casuística. Há poucos estudos nessa área, sendo que o risco em doentes falciformes é maior do que na população geral, sendo talvez algo negligenciado, com indicação inadequada de profilaxia (NOUBIAP *et al.*, 2018).

Dezenove por cento de nossos pacientes tiveram diagnóstico de AVC, sendo que na literatura ocorrem em aproximadamente 11% dos indivíduos homozigotos (SS) com menos de 20 anos (BALKARAM *et al.*, 1992). Nossa casuística incluiu pacientes com AVC na fase adulta.

Úlcera de perna ocorreu em 18,63% dos pacientes. Esse dado varia na literatura já que a distribuição geográfica é variável, afetando 75% dos pacientes com HbSS na Jamaica, mas apenas 8-10% dos pacientes norte-americanos (MINITTI *et al.*, 2010).

A retinopatia ocorreu em 56,7% dos nossos pacientes (n=60). Pode ter ocorrido um viés pelo fato de termos incluído tortuosidades vasculares, que são sinais inespecíficos, e pelo fato de que apenas os pacientes que têm alteração reportem isso ao clínico durante consulta médica, já que nem todos fazem acompanhamento oftalmológico em nossa instituição. Porém, tortuosidade vascular é um sinal descrito na anemia e em hiperviscosidade. Sua frequência no paciente falciforme homozigoto pode chegar a 50% (BONANOMI e LAVEZZO, 2013).

Ao menos um episódio de priapismo ocorreu em 44,8% dos pacientes do gênero masculino. Em pacientes jamaicanos com doença falciforme homozigótica, houve prevalência de 42% de priapismo, com uma idade média de início de 21 anos (EMOND *et al.*, 1980). Esse estudo tem 40 anos, o que nos mostra pouca evolução nessa área.

Quando analisamos a contribuição da genética do inflamassoma, demonstramos que o SNP ganho de função da *IL-1 $\beta$*  (rs16944) está associado a uma forma de apresentação mais branda da doença, sendo um fator protetor. Com isso, pode-se inferir que pacientes com mais produção de *IL-1 $\beta$*  teriam uma manifestação mais leve. Na literatura, Sippert *et al.*, 2017 encontraram o mesmo SNP associado a pacientes DF aloimunizados.

Apesar de não termos detectado *IL-18* nos monócitos do teste *in vitro*, houve associação entre o polimorfismo de perda de função da *IL-18* (rs1834481) com a contagem de leucócitos e monócitos. Foi encontrado apenas um estudo, em murinos, de 2002, que associava *IL-18* com contagens de leucócitos. Nesse caso, a injeção de *IL-18* causava a redução na contagem de leucócitos (HOSOHARA *et al.*, 2002), o que pode estar de acordo com nossos dados, uma vez que a perda de função determinaria uma menor produção de *IL-18* e uma maior contagem.

Encontramos associação entre a interação dos SNPs de ganho de função da *IL-1 $\beta$*  (rs16944) e do *NLRP1* (rs11651270) com hepatopatia. Essa associação é inédita na literatura.

Apesar de não ter sido estatisticamente significativa pela correção de Bonferroni, a variante do gene do *NLRP1*, rs11651270, também resultou mais frequentes nos pacientes classificados com menor gravidade ( $p=0,01$ ). Nas mesmas condições, essa variante foi mais frequente na manifestação clínica retinopatia ( $p=0,01$ ), hepatopatia ( $p=0,02$ ) e nas interações com o SNP do gene da *IL-1 $\beta$*  (rs16944) para as manifestações dor ( $p=0,01$ ) e nefropatia ( $p=0,01$ ). Importante ressaltar que o NLRP1 inflamassoma poderia atuar na patogênese da DF, pois foi relacionado a lesões de endotélio (BLEDA *et al.*, 2014), incluindo um modelo animal com menor progressão de retinopatia diabética quando bloqueada a via NLRP1 (LI *et al.*, 2018). Ademais, seu aumento de expressão foi envolvido no estresse do retículo endoplasmático, situação que ocorre em inflamações crônicas e de saturação da capacidade do retículo (D'OSUALDO *et al.*, 2015). O NLRP1 também atua na hematopoese como um alerta para a Caspase-1 sobre o estresse local e infeccioso (MASTERS *et al.*, 2012).

No estudo celular, os monócitos do paciente AF responderam ao estímulo, o que nos sugere que o componente NLRP3 inflamassoma não está comprometido nessas células. Apesar de Belcher *et al.*, 2000, terem encontrado maior intensidade de fluorescência para *IL-1 $\beta$*  em monócitos de sangue periférico de pacientes falciformes, encontramos diferença do grupo controle, com menor secreção de *IL-1 $\beta$*  nos pacientes ao estímulo com LPS de 3h. Mendonça *et al.*, 2016 não encontrou diferença entre o controle e o paciente. Estudo de 2016 mostrou que a estimulação de macrófagos de pacientes DF, usando LPS, induzia à baixa secreção de *IL-1 $\beta$* , com um aumento apenas quando fizeram co-incubação com heme (SILVEIRA *et al.*, 2016).

As células de PBMC, que contém monócitos e linfócitos, de pacientes falciformes SS, quando comparadas às dos controles normais, desafiadas com ATP/LPS, mostraram níveis mais baixos de secreção de *IL-1 $\beta$* . O teste de FLICA, para avaliar caspase-1 ativada, confirmou esses achados. Nosso resultados são inéditos.



Essa diferença de resposta poderia estar relacionada à ativação linfocitária, pois alguns trabalhos têm demonstrado a expressão de inflamassoma em linfócitos T e B (ALI, DASARI e CARMONA, 2017; PEDICINO *et al.*, 2018). Considerando o trabalho de Balandya *et al.*, 2016, em que os linfócitos dos pacientes DF possuem um comprometimento em sua função com redução na proporção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> circulantes, redução da proporção de células T supressoras de CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, ativação aberrante e disfunção das células T reguladoras (Treg), tendência das células T CD4<sup>+</sup> em direção à resposta Th2 e perda de CD27 secretor de IgM<sup>+</sup> em células B de memória, poderíamos atribuir ao linfócito presente no PBMC essa menor resposta.

Como esperávamos que houvesse maior inflamação no paciente do que no controle, não é possível excluir que outras células contribuam para a secreção de IL-1 $\beta$  no paciente falciforme. Vogel *et al.*, 2018, mostrou que o NLRP3 inflamassoma de plaquetas de pacientes DF tem aumento de regulação, contribuindo para a maior inflamação vista nesse grupo. Também atribuiu-se aos neutrófilos de pacientes com DF uma elevada secreção de IL-1 $\beta$ , que esteve associada a uma atividade aumentada da caspase-1 (MENDONÇA *et al.*, 2016). Considerando que em ambos os testes, a inibição com MCC-950, não teve diferença significativa, com exceção do monócito de 24h com LPS +ATP, pode-se supor a participação de vias não canônicas, uma vez que o LPS ativa também essas vias, através de caspase-4 e 5 (YANG, 2015).

Também, vale ressaltar a possibilidade de que grânulos de stress citoplasmáticos, que protegem da morte celular por piroptose, possam estar participando da inibição do NLRP3, com diminuição da IL-1 $\beta$  (SAMIR *et al.*, 2019). Outros inibidores endógenos como CARD8 ou miR223 (TEZCAN *et al.*, 2019) também podem estar implicados na inibição da via canônica do inflamassoma, porém estudos nessa área ainda são muito recentes.

Como o NLRP3 não pareceu estar mais ativado nos pacientes falciformes, consideramos a participação de outros receptores, como o NLRP1, já que tivemos seus polimorfismos mais frequentemente associados às manifestações clínicas, do que o NLRP3. Porém, o ensaio com Valbopro, um ativador de NLRP1, na dose utilizada, não mostrou diferença entre os dois grupos.

Sabendo que a flagelina em pacientes HIV ativa a via NLRC4, devido ao defeito do NLRP3 nas células desses pacientes ( DOS REIS *et al.*, 2019), fizemos um ensaio com flagelina para testar o receptor NLRC4, porém também não houve diferença estatística.

Quando avaliamos por tipo de tratamento, apesar da amostra pequena, o grupo tratado teve uma tendência à menor produção de IL1 $\beta$  e esses dados estão de acordo com Guarda *et al.*, 2019, que encontrou que a terapia com hidroxiureia reduzia a capacidade dos monócitos para produzir múltiplas citocinas, incluindo IL1 $\beta$ , após a ativação com LPS.

Nosso estudo considerou apenas pacientes em *steady state*, não sabemos o comportamento desses pacientes em um contexto de infecção ou de crise. Ademais, não sabemos o significado clínico dessa menor produção de IL1 $\beta$  e se isso predisporia o paciente a infecções ou a um possível mecanismo regulatório para evitar uma inflamação exacerbada e/ou de morte celular. Outro ponto é o fato de não termos usado moléculas que poderiam ser ativadores endógenos, como heme ou ácido úrico.

Do ponto de vista translacional, nosso estudo é retrospectivo e não foi dirigido para isso, contudo seria possível considerar o polimorfismo da IL1 $\beta$  como um marcador biológico de gravidade na DF.

Esperamos poder contribuir para pesquisas sobre inflamação nesses doentes, pois um melhor conhecimento nessa área possibilitará o desenvolvimento de drogas moduladoras da resposta inflamatória.



- O polimorfismo da IL-1 $\beta$  (rs16944) está associado com a gravidade da doença e mostrou ter associação com dois ou mais comprometimentos de órgãos, ou seja, o polimorfismo é um fator de proteção, estando de acordo, inclusive, com o teste de Bonferroni.
- Ao contrário do que esperávamos, houve pouca contribuição do polimorfismo do NLRP3 inflamassoma na heterogeneidade clínica dos pacientes, além de não termos encontrado uma maior ativação desse inflamassoma em um ensaio funcional.
- A capacidade de resposta a PAMPs (LPS) e DAMPs (ATP) do inflamassoma de pacientes com AF mostrou ser menor do que de indivíduos controles. Nossos achados sugerem que há um comprometimento global da resposta ao desafio celular quando os pacientes são comparados a um controle normal.



ABBAS A. Innate immunity. Disponível em: <http://aim.spbu.ru/images/St.Petersburg-2.-Innate-immunity-converted.pdf>. Acesso em 06 set 2019.

ADESINA O, BRUNSON A, KEEGAN THM, WUN T. Osteonecrosis of the femoral head in sickle cell disease: prevalence, comorbidities, and surgical outcomes in California. **Blood Adv.** V. 2017;1(16):1287–1295. Published 2017 Jul 11. doi:10.1182/bloodadvances.2017005256

ADDOBBATI C, DA CRUZ HLA, ADELINO JE, MELO TAVARES RAMOS AL, FRAGOSO TS, DOMINGUES A et al. Polymorphisms and expression of inflammasome genes are associated with the development and severity of rheumatoid arthritis in Brazilian patients. **Inflamm Res.** 2018 Mar;67(3):255-264.

ALI MF, DASARI H, VAN KEULEN VP, CARMONA EM. anonical Stimulation of the NLRP3 Inflammasome by Fungal Antigens Links Innate and Adaptive B-Lymphocyte Responses by Modulating IL-1beta and IgM Production. **Front Immunol.** 2017 Nov 9;8:1504.

ALMEIDA E, FRANTZ SR, CESAR P, TARRAGO AM, AMORIM XABREGAS L, GARCIA NP, COSTA AG, DE PAULA EV, MALHEIRO A. Frequency of Interleukins IL1ss/IL18 and Inflammasome NLRP1/NLRP3 Polymorphisms in Sickle Cell Anemia Patients and their Association with Severity Score. **Curr Mol Med.** 2019 ( *in press*)

AFENYI-ANNAN A, KAIL M, COMBS MR, ORRINGER EP, ASHLEY-KOCH A, TELEN MJ. Lack of Duffy antigen expression is associated with organ damage in patients with sickle cell disease. **Transfusion.** 2008;48(5):917–24.

ATAGA K.I e STOCKER J. The trials and hopes for drug development in sickle cell disease. **Br J Haematol.** 2015. v.170, p. 768-780.

BALKARAM B, CHAR G, MORRIS JS, THOMAS PW, SERJEANT BE, SERJEANT GR. Stroke in a cohort of patients with homozygous sickle cell disease. **J Pediatr** 1992;120:360

BARRETT JC, FRY B, MALLER J, DALY MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics.** 2005.

BALANDYA E, REYNOLDS T, OBARO S, MAKANI J. Alteration of lymphocyte phenotype and function in sickle cell anemia: Implications for vaccine responses. **American Journal of Hematology.** 2016, 91, 938–946.

BARCLAY W., SHINOHARA M.L. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). **Brain Pathol.** 2017, v.27 (2), p.213-219.

BELCHER JD, MARKER PH, WEBER JP, HEBBEL RP, VERCELLOTTI GM. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood,** 2000, v.96, p.2451–2459.

BLEDA S, DE HARO J, VARELA C, ESPARZA L, FERRUELO A, ACIN F. NLRP1 inflammasome, and not NLRP3, is the key in the shift to proinflammatory state on endothelial cells in peripheral arterial disease. **Int J Cardiol.** 2014. v.15;172(2):e282-4.

BONANOMI, MTBC e LAVEZZO, MM. Sickle cell retinopathy: diagnosis and treatment. **Arq.**

**Bras. Oftalmol.** [online]. 2013, vol.76, n.5

BOOTH C, INUSA B e OBARO S.K. Infection in sickle cell disease: A review. **Internacional Journal of Infectious Disease**. 2010. v.14, e2-e12.

BOWERS AS, REID HL, GREENIDGE A, LANDIS C e REID M. Blood viscosity and the expression of inflammatory and adhesion markers in homozygous sickle cell disease subjects with chronic leg ulcers. **PLoS One**. 2013. v. 8, e68929.

BROZ P, DIXIT VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nat Rev Immunol**. 2016 Jul;16(7):407-20.

BURKE L, HOBART JC, FOX K, LEHRER-GRAIWER J, BRIDGES K, KRAUS M, RAMOS E. The 10-Item Sickle Cell Disease Severity Measure (SCDSM-10): A Novel Measure of Daily SCD Symptom Severity Developed to Assess Benefit of GBT440, an Experimental HbS Polymerization Inhibitor. **Blood**. 2016; 128 (22): 4760. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.4760.4760>.

CAIN DM, VANG D, SIMONE DA, HEBBEL RP, GUPTA K. Mouse models for studying pain in sickle disease: effects of strain, age, and acuteness. **Br J Haematol**. 2012;156(4):535–544.

CANÇADO RD, JESUS JA. A doença falciforme no Brasil. **Rev Bras Hematol Hemoter**. 2007;v. 29(3), p.203-6.

CARGILL M, ALTSHULER D, IRELAND J, SKLAR P, ARDLIE K, PATIL N, SHAW N, LANE CR, LIM EP, KALYANARAMAN N, NEMESH J, ZIAUGRA L et al. Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. **Nat Genet**. 1999 Jul;22(3):231-8. doi: 10.1038/10290.

CASTRO O., BRAMBILLA D. J., THORINGTON B., REINDORF C. A., SCOTT R. B., GILLETTE P., VERA J. C., LEVY P. S. The acute chest syndrome in sickle cell disease: incidence and risk factors. **Blood**. 1994. v 84, p.643-649

CERQUEIRA BA, BOAS WV., ZANETTE AD, REIS MG, GONCALVES MS. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**. 2011, v.56(2), p.471-6.

CHANTRATHAMMACHART P, MACKMAN N, SPARKENBAUGH E, WANG JG, PARISE L V, KIRCHHOFFER D, NIGEL S K, PAWLINSKI R. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. **Blood**. 2012 Jul 19; 120(3): 636–646.

COBER MP e PHELPS SJ. Penicillin prophylaxis in children with sickle cell disease. **J. Pediatr. Pharmacol. Ther**. 2010. v. 15,p. 152–159.

COELHO A, DIAS A, MORAIS A, BALTAZAR N F, LAVINHA J. Sickle cell disease severity scoring: a yet unsolved problem. **European Journal of Haematology**. doi:10.1111/ejh.12011.

COLL RC. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. **Nature Med.** 2015. v. 21(3), p. 248-255.

CONFORTI-ANDREONI C, RICCIARDI-CASTAGNOLI P, MORTELLARO A. The inflammasomes in health and disease: from genetics to molecular mechanisms of autoinflammation and beyond. **Cell Mol Immunol.** 2011; V 8(2), P135–145.

CONRAN N., ALMEIDA C.B., LANARO C., FERREIRA R.P., TRAINA F., SAAD S.T., COSTA F.F. inhibition of caspase-dependent spontaneous apoptosis via a camp-protein kinase a dependent pathway in neutrophils from sickle cell disease patients. **Br. J. Haematol.** 2007, V139, P.148–158.

CONRAN N. e BELCHER J.D. Inflammation in sickle cell disease. **Clin Hemorheol Microcirc.** 2018, v.68(2-3), p.263-299.

CROIZAT H. Circulating cytokines in sickle cell patients during steady state. **Br J Haematol.** 1994 Jul;87(3):592-7.

DOS REIS EC, LEAL VNC, SOARES JLDS, ET AL. Flagellin/NLRC4 Pathway Rescues NLRP3-Inflammasome Defect in Dendritic Cells From HIV-Infected Patients: Perspective for New Adjuvant in Immunocompromised Individuals. **Front Immunol.** 2019;10:1291. Published 2019 Jun 11. doi:10.3389/fimmu.2019.01291

DUNCAN J.A. e CANNA S.W. The NLRC4 inflammasome. **Immunol Rev.** 2018. v. 281, p.115-123.

DUTRA FF, ALVES LS, RODRIGUES D, FERNANDEZ PL, DE OLIVEIRA RB, GOLENBOCK DT, ZAMBONI DS, BOZZA MT. hemolysis-induced lethality involves inflammasome activation by heme. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 2014, v.111,p. E4110-8 .

Emond AM, Holman R, Hayes RJ, Serjeant GR. Priapism and Impotence in Homozygous Sickle Cell Disease. **Arch Intern Med.** 1980;140(11):1434–1437.

GATTORNO M. Pattern of interleukin-1beta secretion in response to lipopolysaccharide and ATP before and after interleukin-1 blockade in patients with CIAS1 mutations. **Arthritis Rheum**,2007. v. 56, n. 9, p. 3138-48.

GUASCH A, NAVARRETE J, NASS K ET AL. Glomerular involvement in adults with sickle cell hemoglobinopathies: Prevalence and clinical correlates of progressive renal failure. **J Am Soc Nephrol.** 2006. v 17, p. 2228–2235.

GUARDA CC, SILVEIRA-MATTOS PSM., YAHOUÉDÉHOU SCMA. et al. Hydroxyurea alters circulating monocyte subsets and dampens its inflammatory potential in sickle cell anemia patients. **Sci Rep** 9, 14829 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51339-x>



GUO, H.; CALLAWAY, J. B.; TING, J. P. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. **Nat Med**, 2015. v. 21, n. 7, p. 677-87.

HALL, SK; et al. Correlation of polymorphic variation in the promoter region of the interleukin-1 beta gene with secretion of interleukin-1 beta protein. **Arthritis Rheum**, v. 2004, p. 1976-1983.

HAMEED I, MASOODI SR, MALIK PA, MIR SA, GHAZANFAR K, GANAI BA. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression. **Gene**. 2018. 30;661:51-59. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.095. Epub 2018 Mar 29.

HE, M; et al. Genome-wide association study identifies variants at the IL18-BCO2 locus associated with interleukin-18 levels. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 2010, p. 885–890.

HEBBEL RP, OSAROGIAGBON R E KAUL D. The endothelial biology of sickle cell disease: inflammation and a chronic vasculopathy. **Microcirculation**. 2004 Mar;11(2):129-51.

HEBBEL, RP. Ischemia-reperfusion injury in sickle cell anemia: relationship to acute chest syndrome, endothelial dysfunction, arterial vasculopathy, and inflammatory pain. **Hematol Oncol Clin North Am**, 2014, 28(2): 181-198.

HITOMI, Y; et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 2009, p. 779 – 785.

HOFFMAN, H. M.; BRODERICK, L. The role of the inflammasome in patients with autoinflammatory diseases. **J Allergy Clin Immunol**, 2016, v. 138, n. 1, p. 3-14.

HOSOHARA K, UEDA H, KASHIWAMURA S, YANO T, OGURA T, MARUKAWA S, OKAMURA H. Interleukin-18 induces acute biphasic reduction in the levels of circulating leukocytes in mice. **Clin Diagn Lab Immunol**. 2002 Jul;9(4):777-83.

INGRAM, V. M. Gene Mutations in Human Hemoglobin: the Chemical Difference Between Normal and Sickle Cell Hemoglobin. **Nature**. 1957, 180(4581), 326–328.

KATO, G. J., M. T. GLADWIN AND M. H. STEINBERG. Deconstructing sickle cell disease: reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. **Blood**. 2007. 21(1): 37-47.

KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y, HE Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. **Int J Mol Sci**. 2019 Jul 6;20(13).

LANDRUM MJ, LEE JM, BENSON M, BROWN GR, CHAO C, CHITIPIRALLA S, GU B, HART J, HOFFMAN D, JANG W, KARAPETYAN K, KATZ K, LIU C, MADDIPATLA Z, MALHEIRO A, MCDANIEL K, OVETSKY M, RILEY G, ZHOU G, HOLMES JB, KATTMAN

BL, MAGLOTT DR. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. **Nucleic Acids Res** . 2018 Jan 4.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V. M. Mechanisms and functions of inflammasomes. **Cell**,2014. v. 157, n. 5, p.1013-22.

LEONARD D.G.B. **Molecular Pathology in Clinical Practice**. Springer.2016, p.230.

LEVANDOWSKI, CB; et al. NLRP1 haplotypes associated with vitiligo and autoimmunity increase interleukin-1 $\beta$  processing via the NLRP1 inflammasome. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2013. v. 2013, p.2952–2956.

LI Y, LIU C, WAN XS, LI SW. NLRP1 deficiency attenuates diabetic retinopathy (DR) in mice through suppressing inflammation response. **Biochem Biophys Res Commun**. 2018. v501, p. 351-357.

LIU X, ZHANG Z, RUAN J, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature**. 2016;535(7610):153–158.

LUM, A. F. H., WUN, T., STAUNTON, D. & SIMON, S. I. Inflammatory potential of neutrophils detected in sickle cell disease. **Am. J. Hematol**. 2004, v 76, p 126–133.

MANTOVANI A, DINARELLO CA, MOLGORA M e GARLANDA C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity**, 2019. V. 50(4), p.778–795.

MASTERS SL, GERLIC M, METCALF D, PRESTON S, PELLEGRINI M, O'DONNELL JA, MCARTHUR K, BALDWIN TM, CHEVRIER S, NOWELL CJ, CENGIA LH. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**.2012. v.37, p. 1009-23.

MAROTTA C.A., WILSON J.T., FORGET B.G., WEISSMAN S.M. Human beta-globin messenger RNA. III. Nucleotide sequences derived from complementary DNA. **Journal of Biological Chemistry**. 1977, 252, 5040–5053 .

MARTINON F; BURNS K; TSCHOPP J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. **Mol Cell**. 2002. v. 10, n. 2, p. 417-26, Aug 2002.

MATTEINI AM, LI J, LANGE EM, TANAKA T, LANGE LA, TRACY RP, ET AL. Novel gene variants predict serum levels of the cytokines IL-18 and IL-1 $\alpha$  in older adults. **Cytokine**. 2014;65:10–16.

MCKINNEY C, STAMP LK, DALBETH N, et al. Multiplicative interaction of functional inflammasome genetic variants in determining the risk of gout. **Arthritis Res Ther**. 2015;17:288.

MENDONÇA R, SILVEIRA AA, PERICOLE FV, SEGUIN C, LEONARDO FC, SAAD STO, COSTA FF, CONRAN N. Inflammasome Dependent IL-1 $\beta$  Release from Neutrophils in Human Sickle Cell Anemia. **Blood**. 2016;v.128(22), p.854.

MIKOBI T.M., TSHILOBO P.L., ALONI M.N., LELO G.M., AKILIMALI P.Z., MUYEMBE-TAMFUM J.J., RACE V., MWAMBA J.M.M. Correlation between the lactate dehydrogenase levels with laboratory variables in the clinical severity of sickle cell anemia in Congolese patients. **PLoS ONE**. 2015. v.10 (5) , art. no. e0123568.

MINNITI CP, ECKMAN J, SEBASTIANI P, STEINBERG MH, BALLAS SK. Leg ulcers in sickle cell disease. **Am J Hematol**. 2010;85(10):831–833. doi:10.1002/ajh.21838

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (US). Genetics Home Reference [Internet]. Bethesda (MD): The Library; 2013 Sep 16 [cited 2013 Sep 19]. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/>. Acesso em 06 set 2019.

NOUBIAP, J.J., TEMGOUA, M.N., TANKEU, R. ET AL. Sickle cell disease, sickle trait and the risk for venous thromboembolism: a systematic review and meta-analysis. **Thrombosis J** 16, 27 (2018). <https://doi.org/10.1186/s12959-018-0179-z>

OLANIRAN KO, ENEANYA ND, NIGWEKAR SU, VELA-PARADA XF, ACHEBE MM, SHARMA A, THADHANI RI. Sickle Cell Nephropathy in the Pediatric Population. **Blood Purif** .2019. v.47:205-213.

ORSINI E, PASQUALE A, MAGGIO R, CALABRESE E, MAURO FR, GIAMMARTINI E, GUARINI A, FOA R. Phenotypic and functional characterization of monocyte-derived dendritic cells in chronic lymphocytic leukaemia patients: influence of neoplastic CD19 cells in vivo and in vitro. **Br J Haematol**. 2004, v125(6), p720-8.

OWUSU-ANSAH, A., IHUNNAH, C. A., WALKER, A. L. & OFORI-ACQUAH, S. F. Inflammatory targets of therapy in sickle cell disease. 2016.**Transl. Res.** v.167, (1), p.281-97.

PAULING L, ITANO HA. Sickle cell anemia a molecular disease. **Science**. 1949. v.110, p.543–548

PATHARE A, AL KINDI S, ALNAQDY AA, DAAR S, KNOX-MACAULAY H, DENNISON D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am J Hematol**. 2004; v. 77, p.323-8.

PATEL, MN. Inflammasome Priming in Sterile Inflammatory Disease. **Trends Mol Med**, 2017. v. 23, n. 2, p. 165-180.

PLATT, O. S. Sickle cell anemia as an inflammatory disease. **J. Clin. Invest**. 2000. v. 106 (3),p. 337-8.

PLATT OS, BRAMBILLA DJ, ROSSE WF, MILNER PF, CASTRO O, STEINBERG MH,

KLUG PP. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **N Engl J Med**. 1994 Jun 9;330(23):1639-44.

PEDICINO D, GIGLIO AF, MUGGIO A, MASSARO G, D'AIELLO A, TROTTA F ET AL. Inflammasome, T Lymphocytes and Innate-Adaptive Immunity Crosstalk: Role in Cardiovascular Disease and Therapeutic Perspectives. **Thromb Haemost**. 2018 Aug;118(8):1352-1369.

PERELMAN N., SELVARAJ S.K., BATRA S., LUCK L.R., ERDREICH-EPSTEIN A., COATES T.D., KALRA V.K., MALIK P. Placenta growth factor activates monocytes and correlates with sickle cell disease severity. **Growth (Lakeland)**. 2003 , v.102,p.1506–1514.

PITANGA TN, , OLIVEIRA RR, ZANETTE DL, GUARDA CC, SANTIAGO RP, SANTANA SS, NASCIMENTO VML, LIMA JB, CARVALHO GQ, MAFFILI VV, CARVALHO MOS, ALCANTARA LCJ, BORGES VM, GONCALVES MS. Sickle red cells as danger signals on proinflammatory gene expression, leukotriene B4 and interleukin-1 beta production in peripheral blood mononuclear cell. **Cytokine**. 2016. V.83, p.75-84.

QARI MH, DIER U, MOUSA SA. Biomarkers of inflammation, growth factor, and coagulation activation in patients with sickle cell disease. **Clin Appl Thromb Hemost**. 2012. v.18(2), p.195-200.

RAMACHADRAN AR, LUPFER C, ZAKI H. Chapter three: The inflammasome: regulation of nitric oxide and antimicrobial host defense. **Advances in Microbial Physiology**. v 72, p.65-115.

RAZMARA M., SRINIVASULA S.M., WANG L., POYET J.L., GEDDES B.J., DISTEFANO P.S., BERTIN J., ALNEMRI E.S. CARD-8 protein, a new CARD family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **J Biol Chem**. 2002, v. 19;277(16), p.13952-8.

SAAVEDRA P.H.V, DEMON D., VAN GORP H., LAMKANFI, M. Protective and detrimental roles of inflammasomes in disease. **Seminars in Immunopathology**. 2015, v.37, p. 313–322

SAMIR P, KESAVARDHANA S, PATMORE DM, DINGRAS S, MALIREDDI RKS, KARKI R, GUY CS, BRIARD B, PLACE DE, BHATTACHARYA A, SHARMA BR, NOURSE A ET AL. DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome. **Nature**. 2019 Sep;573(7775):590-594. doi: 10.1038/s41586-019-1551-2.

SAVITT TL E GOLDBERG MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. **JAMA**. 1989. Jan 13;261(2):266-71.

SCRIVER J. B.E WAUGH T.R. Studies on a case of sickle cell anemia. **Can Med Assoc J**. 1930 Sep; 23(3): 375–380.

SEBASTIANI P, NOLAN VG, BALDWIN CT, ABAD-GRAU MM, WANG L, ADEWOYE AH, MCMAHON LC, FARRER LA, TAYLOR JG, KATO GJ, GLADWIN MT, STEINBERG MH. A network model to predict the risk of death in sickle cell disease. **Blood** 2007; 110: 2727–35.

SHAPIRO BS, BENJAMIN LJ, PAYNE R, ET AL: Sickle cell-related pain: perceptions of medical practitioners. **J Pain Symptom Manage**. 1997. v14:168.

SHAH R, TABORDA C, CHAWLA S. Acute and chronic hepatobiliary manifestations of sickle cell disease: A review. **World J Gastrointest Pathophysiol**. 2017. V. 8(3): 108-116.

SHIRINER D., ROTIMI CN. Whole genome sequence based haplotypes reveal single origin of the sickle allele during the Holocene Wet Phase. **Amer Jour Human Genetics**. 2018. v.102,p. 547-556.

SILVEIRA AA, CUNNINGHAM C, CORR E, FERREIRA WA, COSTA FF, ALMEIDA CB, CONRAN N, DUNNE A. Heme Induces NLRP3 Inflammasome Formation in Primary Human Macrophages and May Propagate Hemolytic Inflammatory Processes By Inducing S100A8 Expression. **Blood**. 2016; 128 (22): 1256. doi: <https://doi.org/10.1182/blood.V128.22.1256.1256>

SIPPET E.A, VISENTAINER J.E.L., ALVES H.V, RODRIGUES C., GILLI S.C.O., ADDAS-CARVALHO M., SAAD S.T, COSTA F.F., CASTILHO L. Red blood cell alloimmunization in patients with sickle cell disease: correlation with HLA and cytokine gene polymorphisms. **Immunohematology**. 2017. v.57, p. 379-389.

SLUYTER R, SHEMON AN, WILEY JS. Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 $\beta$  release from human monocytes. **J Immunol** 2004; 172: 3399-405.

SOARES, J. L. S., FERNANDES, F. P., PATENTE, T. A., MONTEIRO, M. B., PARISI, M. C., GIANNELLA-NETO, D., PONTILLO, A. Gain-of-function variants in NLRP1 protect against the development of diabetic kidney disease: NLRP1 inflammasome role in metabolic stress sensing? **Clinical Immunology**. 2018. v.187, p.46–49.

STEINBERG MH. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol**. 2005; v.129, p.465-81.

STEINBERG MH e SEBASTIANI P. Genetics modifiers of sickle cell disease. **American Journal of Hematology**. 2012. Disponível em : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ajh.23232>. Acesso em 08 set 2019.

SUNDD P., GLADWIN M.T., NOVELLI E.M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. **Annu Rev Pathol**. 2019 Jan 24;14:263-292.

TEZCAN G, MARTYNOVA EV., GILAZIEVA ZE., MCINTYRE A, RIZVANOV A, KHAIBOULLINA SF. MicroRNA Post-transcriptional Regulation of the NLRP3 Inflammasome in Immunopathologies. **Frontiers in Pharmacology** .2019. v.10, p.451.

VAN BEERS EJ, YANG Y, RAGHAVACHARI N, TIAN X, ALLEN DT, NICHOLS JS, MENDELSON L, NEKHAI S, KATO GJ. Iron, inflammation, and early death in adults with sickle cell disease. **Circ Res**. 2015 Jan 16;116(2):298-306.

VERMA D et al. The Q705K polymorphism in NLRP3 is a gain-of-function alteration leading to excessive interleukin- 1 $\beta$  and IL-18 production. **PLoS One**, v. 2012, p. e34977, 2012.

VICARI P, ADEGOKE SA, MAZZOTTI DR, CANÇADO RD, NOGUTTI MA, FIGUEIREDO MS. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 gene polymorphisms are associated with manifestations of sickle cell anemia. **Blood Cells Mol Dis**. 2015, v.54(3), p.244-9.

VOGEL S., ARORA T., WANG X., MENDELSON L., NICHOLS J., ALLEN D., SHET A.S., COMBS C.A., QUEZADO Z.M.N., THEIN S.L. The platelet NLRP3 inflammasome is upregulated in sickle cell disease via HMGB1/TLR4 and Bruton tyrosine kinase. **Blood Adv**. 2018, v.2(20),p.2672-2680.

WANDERER A.A. Rationale for IL-1 $\beta$  Targeted Therapy for Ischemia-Reperfusion Induced Pulmonary and Other Complications in Sickle Cell Disease. **J. Pediatr. Hematol. Oncol**. 2009. v.31, p. 537–538.

WESSELIUS A, BOURS MJ, HENRIKSEN Z, et al. Association of P2X7 receptor polymorphisms with bone mineral density and osteoporosis risk in a cohort of Dutch fracture patients. **Osteoporos Int**. 2013;24(4):1235–1246. doi:10.1007/s00198-012-2059-x

YANG, J, ZHAO, Y E SHAO, F. Non-canonical activation of inflammatory caspases by cytosolic LPS in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**. 2015. DOI: 32. 10.1016/j.coi.2015.01.007.

YU Y et al. Genetic polymorphisms in IL1B predict susceptibility to steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in Chinese Han population. **Osteoporos Int**. 2019 Apr;30(4):871-877. doi: 10.1007/s00198-019-04835-9. Epub 2019 Mar 9.

ZELLER T, HAASE T, MÜLLER C, et al. Molecular Characterization of the NLRC4 Expression in Relation to Interleukin-18 Levels. **Circ Cardiovasc Genet**. 2015;8(5):717–726. doi:10.1161/CIRCGENETICS.115.001079

ZHANG, D., C. Xu, D. Manwani and P. S. Frenette (2016). Neutrophils, platelets, and inflammatory pathways at the nexus of sickle cell disease pathophysiology. **Blood** 127(7): 801-809.

ZHU Z, YAN J, GENG C, WANG D, LI C, FENG S, WANG H. Polymorphism Within the 3'UTR of NLRP3 is Associated with Susceptibility for Ischemic Stroke in Chinese Population. **Cell Mol Neurobiol**. 2016 Aug;36(6):981-988. doi: 10.1007/s10571-015-0288-1.



## Anexos 1:

### 8.1. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Avaliação da via dos inflamassomas nas plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme

#### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

##### Avaliação da via dos inflamassomas nas plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme

Para obter um maior conhecimento da Anemia Falciforme os médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisa clínica científica. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que pretende identificar algumas moléculas possivelmente envolvidas Anemia Falciforme, em amostras de sangue (plaquetas) de pacientes em transfusão crônica, sem tratamento e em uso de hidroxiureia para conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento.

Dessa forma, você está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando a coleta de 10ml sangue para realização da pesquisa. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você, pois estamos colhendo um tubo além do necessário para a realização dos seus exames de rotina. O material colhido não será utilizado para estudos posteriores, portanto não armazenaremos a amostra de seu sangue.

Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o sigilo sobre seu nome e seus dados.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo no CAAE 70891517.9.0000.5505.

Concordando com a utilização deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, sobre o seu tratamento ou de parentes e conhecidos seus. Você receberá uma via deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são Valéria de Freitas Dutra e Thaís Priscila Biassi, que deverão assinar/rubricar este documento. Ambas podem ser encontradas na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia (Rua Diogo de Faria, 824 3º andar). Telefone(s) 5579-1550 e 5576-4240. Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética da UNIFESP/EPM – Rua Botucatu, 572, 1º andar cj 14. Fone 5571-1062, FAX 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo “**Avaliação da via dos inflamassomas nas plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme**”. Fui avaliada em uma consulta previa com a Dra. Valéria em que pude discutir sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que terei garantia de acesso ao tratamento hospitalar independente de minha participação ou não nesse estudo.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido ou no meu atendimento neste serviço.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do Paciente/Representante legal: \_\_\_\_\_

Data: \_\_/\_\_/\_\_

Testemunha: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Responsável pelo projeto: \_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_.



## 8.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Homens: Identificação de fatores associados às manifestações clínicas da Anemia Falciforme

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Homens

#### Identificação de fatores associados às manifestações clínicas da Anemia Falciforme

Para obter um maior conhecimento da Anemia Falciforme os médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisa clínica científica. Essas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo, que visa conhecer melhor os mecanismos da doença e, portanto, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Além disso, este trabalho envolve a busca de outras alterações genéticas que podem contribuir na gravidade da doença.

Por isso, você está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando utilização das amostras de sangue já coletadas e armazenadas anteriormente referentes ao projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo no **0587/11**. O uso deste material não implicará riscos adicionais para você. O material colhido será estocado para análises adicionais que serão feitas no Brasil ou no exterior (Estados Unidos da América).

Durante esta pesquisa, serão analisados também os seguintes exames que fazem parte da rotina do nosso ambulatório:

- ☐ ecocardiograma doppler transtorácico – exame que serve para avaliar a função cardíaca, onde é colocado um sensor no tórax para observar o coração e que não traz risco ao paciente;
- ☐ doppler transcraniano – exame para avaliar o fluxo sanguíneo nas artérias cerebrais, importante para o diagnóstico e prevenção de derrame cerebral (acidente vascular encefálico). Neste exame é colocado um sensor na altura da têmpora que mede o fluxo de sangue, sem risco para o paciente;
- ☐ polissonografia – exame realizado para avaliar o sono e a possibilidade de queda de oxigenação durante o sono. Este exame é feito à noite, em local específico (Instituto do sono), com a colocação de terminais sensíveis (não-invasivos) em couro cabeludo, ostio das narinas, queixo, tórax, abdômen e pernas. Além disso, será medida a oximetria de dedo, isto é, medida da concentração de oxigênio no sangue através de aparelho colocado no dedo do paciente sem necessidade de uso de agulha ou outro material cortante. Será colocado sensor específico na base do pênis para avaliação de rigidez peniana para identificar o risco de priapismo. Este exame também não traz risco para o paciente.

Todo o material colhido e usado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Paulo, de acordo com o processo no **0587/11**.

Concordando com a utilização deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em permitir o uso deste material para pesquisa, sua decisão não influenciará, de nenhum modo, sobre o seu tratamento ou de parentes e conhecidos seus. Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os principais investigadores são as Dras Thaís Priscila Biassi, Ana Carolina Cabañas Pedro e Grazielle Mecabô, que deverão assinar/rubricar este documento, podem ser encontradas na Disciplina de Hematologia e Hemoterapia (Rua Diogo de Faria, 824 3º andar). Telefone(s) 5579-1550 e 5576-4240. Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida pelo seu médico, por gentileza, entre em contato com a Comissão de Ética da UNIFESP/EPM – Rua Botucatu, 572, 1º andar cj 14. Fone 5571-1062, FAX 5539-7162.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo “**IDENTIFICAÇÃO DE FATORES ASSOCIADOS ÀS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ANEMIA FALCIFORME**”. Eu discuti com a Dra. Sandra/Grazielle/Ana Carolina sobre a minha decisão em participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste serviço.

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

**Assinatura do Paciente/Representante** \_\_\_\_\_

**Legal:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

**Testemunha:** \_\_\_\_\_

**Data:** \_\_/\_\_/\_\_

*(Somente para o responsável do projeto)*

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

**Responsável pelo projeto:** \_\_\_\_\_

## Anexos 2.Tabelas

**Tabela 18 - Resultado detalhado da análise de distribuição de variantes e gravidade da DF.** São detalhados os resultados da análise multivariada da distribuição dos SNPs de acordo com a gravidade da DF. São reportados a identificação da variante (SNP ID), o genótipo e a distribuição no grupo considerado, os valores de  $p$  ajustados por gênero, idade e fenótipo, de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC).

Gravidade						
SNP ID	Genotipo	DF grave (n=84)	DF leve (n=77)	$p_{adj}$	OR	95% IC
rs11651270	C/T-C/C	41 (0,58)	54 (0,76)	0,01	0,34	0,17-0,8
	T/T	30 (0,42)	17 (0,24)			
rs1834481	C/C	37 (0,58)	24 (0,76)	0,025	3,4	1,12-10,28
	C/G-G/G	6 (0,42)	14 (0,24)			
rs3751143	A/C	34 (0,94)	37 (0,7)	0,005	6,58	1,38-31,44
	A/A-C/C	2 (0,6)	16 (0,3)			

Fonte: Autor.

**Tabela 19 - Resultado detalhado da análise do rs16944 (*IL-1 $\beta$* ) associado com a manifestação clínica osteonecrose.** São detalhados os resultados da análise multivariada da distribuição do SNP rs16944 de acordo com a manifestação clínica osteonecrose, corrigido por gênero, idade, fenótipo e transfusão. São reportados a identificação da variante (SNP ID), o genótipo e a distribuição no grupo considerado, os valores de  $p$  ajustados por gênero, idade e fenótipo, de Odds Ratio (OR) com os respectivos intervalos de confiança (95% IC).

Osteonecrose						
SNP ID	Genotipo	Não (n=74)	Sim (n=34)	$p_{adj}$	OR	95% IC
rs16944	A/G	25 (0,34)	22 (0,65)	0,002	3,79	1,55-9,27
	G/G-A/A	49 (0,66)	12 (0,35)			

Fonte: Autor.

**Tabela 20 - Resultado detalhado da análise de manifestações clínicas trombóticas e os 10 SNPs escolhidos no modelo codominante.** Foram feitas correções por gênero, idade e fenótipo. Nota-se que não houve significado estatístico.

SNP	$p$
rs12150220	0,17
rs11651270	0,38
rs35829419	0,33
rs479333	0,30
rs2043211	0,80
rs16944	0,26
rs1834481	0,94
rs10754558	0,92
rs2230911	0,90
rs3751143	0,7

Fonte: Autor.

**Tabela 21 - Resultado detalhado da análise de aumento de ácido úrico e os 10 SNPs escolhidos no modelo codominante.** Foram feitas correções por gênero, idade e fenótipo. Nota-se que não houve significado estatístico.

<b>SNP</b>	<b>p</b>
rs12150220	0,59
rs11651270	0,44
rs35829419	0,056
rs479333	0,45
rs2043211	0,75
rs16944	0,37
rs1834481	1
rs10754558	0,15
rs2230911	0,41
rs3751143	0,55

Fonte: Autor.

#### 8.4. Parecer consubstanciado do CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da via dos inflamassomas nas plaquetas de pacientes com Anemia Falciforme

**Pesquisador:** VALERIA DE FREITAS DUTRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 70891517.9.0000.5505

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.179.178

##### Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0755/2017

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária, recessiva, resultante de uma inversão de uma base de par (A=T), no sexto códon do gene da beta globina, substituindo o ácido glutâmico por valina. Apesar dos princípios gerais de genética molecular e biologia celular já terem sido descritos, na prática clínica existe grande variabilidade interindividual quanto às manifestações. Além da hipoperfusão tecidual e falcização, há participação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, aumento do número de leucócitos e maior ativação de neutrófilos, monócitos, plaquetas e células endoteliais. Nos últimos anos, a ativação do inflamassoma foi descrita como importante fator na resposta imune inata. Trata-se de um complexo multimérico de proteínas citoplasmáticas, que, uma vez ativadas, geram uma via final em que a pró-interleucina (IL)-1 e a pró IL-18 são clivadas e transformadas em suas formas ativas. Isso acaba desencadeando ativação de outras vias inflamatórias intracelulares, além de recrutamento leucocitário e estresse oxidativo, com a produção de ROS. Esse mecanismo parece estar relacionado a uma variedade de doenças. Esse trabalho tem como objetivo verificar se há ativação da via do inflamassoma em plaquetas de pacientes com anemia falciforme.

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP **Município:** SÃO PAULO

**Telefone:** (11)5571-1062

**Fax:** (11)5539-7162

**E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.179.178

#### **Objetivo da Pesquisa:**

- Hipótese: Inflamassomas das plaquetas de pacientes com anemia falciforme estão mais ativadas do que grupo controle normal.
- Objetivo Primário: Demonstrar a existência da ativação dos inflamassomas em plaquetas de pacientes com anemia falciforme.
- Objetivo Secundário: Avaliar se há influência do tratamento sobre essa ativação, de acordo com grupos de tratamento ( Hidroxiureia, sem tratamento e em transfusão).

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

- Riscos: O risco está relacionado a punção local. O material sera coletado juntamente com exames de rotina do paciente, por profissional capacitado, não o expondo a riscos adicionais. Sobre a punção é possível de haver hematoma local ou necessidade de mais de uma punção.
- Benefícios: Não há benefício individual. No ponto de vista científico, há contribuição no que se refere a doença falciforme , doença hereditária, negligenciada que estima-se atingir cerca de 30000 brasileiros.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de projeto de doutorado de Valéria de Freitas Dutra. Orientadora: Dra. Maria Stella Figueiredo. Colaboradora: Dra. Karina Ramalho Bortoluci. Projeto vinculado ao Departamento de Oncologia Experimental, Disciplina de Hematologia e Hemoterapia, EPM, UNIFESP;

TIPO DE ESTUDO: Observacional

LOCAL: ambulatório de Anemias hereditárias da Unifesp,

PARTICIPANTES: Pacientes maiores de 18 anos que acompanham no ambulatório de Anemias hereditárias, com eletroforese compatível com homozigose (SS). O grupo controle será formado por pacientes da mesma faixa etária com eletroforese de hemoglobina AA, hígidos, doadores de sangue.

-Critério de Inclusão: Serão incluídos pacientes sem crise há mais de 3 meses e em tratamento, com hidroxiureia ou transfusão há pelo menos 6 meses. O grupo controle sera constituído por amostras de sangue de doadores de sangue total no Hemocentro Unifesp.

-Critério de Exclusão: Serão excluídos pacientes com doenças inflamatórias conhecidas ou em uso

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14

**Bairro:** VILA CLEMENTINO

**CEP:** 04.023-061

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)5571-1062

**Fax:** (11)5539-7162

**E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com





Continuação do Parecer: 2.179.178

de imunossupressores. Também serão excluídos aqueles com uso de AAS ou anti-inflamatórios nos últimos 7 dias, gestantes, síndrome metabólica, portadores de vírus de hepatite B, C ou HIV e aqueles que não assinarem o termo de consentimento.

**PROCEDIMENTOS:**

-Material e métodos: serão colhidas amostras de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme mediante termo de consentimento livre e esclarecido aprovado previamente pelo um comitê de ética da Unifesp. Haverá separação das plaquetas e posterior ativação plaquetária. Para confirmação da presença da via do inflamassoma serão usadas técnicas de ELISA e Western Blott. Justificativa: o mecanismo de inflamação nos doentes falciformes ainda é desconhecido. Sabendo-se que a plaqueta tem atividade inflamatória e que provavelmente está imunologicamente hiperativada nos pacientes falciformes, investigaremos se existe a participação do inflamassoma plaquetário na inflamação crônica, o que poderia servir como um alvo terapêutico. Isso ainda é algo inédito na literatura.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.

2-TCLE a ser aplicado aos participantes

3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:

a)-autorização da COEP (Pasta: Declaração de Instituição e Infraestrutura Submissão 2; Documento: Infraestrutura.pdf)

**Recomendações:**

sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

aprovado

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios semestrais (no caso de estudos pertencentes à área temática especial) e anuais (em todas as outras situações). É também obrigatória, a apresentação do relatório final, quando do término do estudo.

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com





Continuação do Parecer: 2.179.178

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_863283.pdf	04/07/2017 13:45:49		Aceito
Outros	CEP.pdf	04/07/2017 13:40:30	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito
Folha de Rosto	rosto.pdf	04/07/2017 13:39:00	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	14/06/2017 13:18:57	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_final_coop.docx	14/06/2017 13:13:17	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	14/06/2017 13:09:45	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_amostras_Valeria.docx	28/03/2017 01:15:21	VALERIA DE FREITAS DUTRA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 19 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**Miguel Roberto Jorge**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Botucatu, 572 1º Andar Conj. 14  
**Bairro:** VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.023-061  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** secretaria.cepunifesp@gmail.com

## Abstract

In spite of having a molecular basis, Sickle cell disease (SCD) is an inflammatory state with abnormal cell activation. Physiopathological factors are not completely understood, but it is known that interleukins plays an important role in inflammation. Inflammasome complex is an innate immune pathway involved in the production of active IL-1 $\beta$  and IL-18. The participation of this complex in sickle cell disease is still not clear. Polymorphisms of inflammasome are simple amino acid substitution that can lead to a loss or gain of function and may be associated with clinical manifestations. NLRP3 is the most studied and well-known inflammasome, associated especially to auto-inflammatory diseases. **Aim:** To analyze the contribution of inflammasome to the clinical heterogeneity of SCD. To this, the association of inflammasome gene polymorphisms and a functional *in vitro* study were performed. **Methods:** In the association study 161 patients were included. Retrospective data were collected to fill clinical and laboratorial information. Patients were classified in two different groups: mild (0-1) or severe ( $\geq 2$  organ damage). DNA samples were collected from 88 patients and 73 were used from a biorepository (BR-116). Minor allelic frequency and literature information were used to choose 10 SNPs. Real-time PCR technique with allele and specific probes was used in TaqMan® assays (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). To functional study (n=7), PBMC and monocytes from healthy patients and controls were challenged with LPS and / or ATP, with subsequent IL-1 $\beta$  dosage by the ELISA method. All volunteers received a free and informed consent form. Multivariate analysis were performed by the software R Studio 3.5.3 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)), SNP association package. Mann-Whitney test was applied to group comparison. **Results:** The gain-of-function polymorphism rs16944 has resulted in a significant protection factor for SCD severity. The loss of function variant in the IL18 gene (rs1834481) was associated to high count of monocytes and leucocytes. In the functional test, patients with SCD tend to have less inflammasome activation when compared to controls. **Conclusion:** The promoter variant -511 C>T in IL1 $\beta$  resulted significantly associated to mild presentation in SCD patients (padj=0.001). PBM analysis showed that SCD cells seems to be less prone to activate inflammasome than HD.